

揮発毒性物質濃縮技術（NeedlEx濃縮法）を用いた 体液試料からの微量物質測定法

著者	鈴木 康仁
発行年	2018
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102甲第8674号
URL	http://doi.org/10.15068/00152457

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

揮発毒性物質濃縮技術（NeedlEx 濃縮法）
を用いた体液試料からの微量物質測定法

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

鈴木 康 仁

目次

第1章 緒言	1
1.1 法医学における薬毒物	1
1.1.1 薬毒物鑑定の意義	1
1.1.2 薬毒物中毒の情勢	2
1.1.3 薬毒物の分析法	3
1.2 薬毒物の抽出	4
1.2.1 液液抽出法	4
1.2.2 固相抽出法	5
1.2.3 ヘッドスペース法	6
1.3 NeedleEx 濃縮法	7
1.4 本研究の目的	9
第2章 体液試料からのカルバメートの分析への NeedleEx®の応用	10
2.1 序論	10
2.2 実験材料と方法	11
2.2.1 試薬と材料	11
2.2.2 サンプル調製	12
2.2.3 GC-MS 分析条件	13
2.3 結果	14
2.3.1 加水分解の反応条件の最適化	14
2.3.2 クロロギ酸メチルによる誘導体化条件の最適化	16
2.3.3 誘導体化カルバメートのクロマトグラム	18
2.3.4 誘導体化カルバメートのマススペクトル	20
2.3.5 誘導体化カルバメート分析における検量線、検出限界、精度	22
2.4 考察	28
2.4.1 クロロギ酸メチルによる誘導体化条件の最適化	28
2.4.2 誘導体化カルバメートの GC-MS 分析結果	29
2.5 結論	30

第3章 焼死体血液からの燃焼由来物質（CVSs）の分析への NeedlEx [®] の応用	31
3.1 序論	31
3.2 実験材料と方法	32
3.2.1 試薬と材料	32
3.2.2 サンプル調製	34
3.2.3 GC-MS 分析条件	35
3.2.4 焼死体血液中の COHb 飽和度およびシアン化物濃度の測定	36
3.2.5 統計分析	37
3.3 結果	38
3.3.1 SVCs のスクリーニング分析結果	38
3.3.2 建物火災による焼死の 36 事例	42
3.3.3 灯油による焼身自殺の 17 事例	44
3.3.4 ガソリンによる焼身自殺の 6 事例	47
3.3.5 CVSs の検出数が少ない事例	51
3.3.6 CVSs 検出頻度の算出	52
3.3.7 血液中の CVSs と COHb、シアン化物、煤の量の関連性	54
3.4 考察	56
3.4.1 CVSs 検出頻度の考察	56
3.4.2 CVSs の発生源	57
3.4.3 血液中の CVSs と COHb、シアン化物、煤の量の関連性	58
3.4.4 喫煙の影響	59
3.5 結論	61
第4章 結言	63
引用文献	64
略語一覧	80
謝辞	82

第1章 緒言

1.1 法医学における薬毒物

1.1.1 薬毒物鑑定の意義

犯罪がますます巧妙化する近年において、変死体からの薬毒物の鑑定は凶悪な重要事件の捜査の端緒にもなりうるため、非常に重要視されている。薬毒物鑑定が未実施であることにより、犯罪を見逃すことになれば、重要事件の放置に繋がることとなり、社会の治安維持に大きな支障をもたらしかねない。

法医学において、薬毒物鑑定は、一般的には血液を分析対象とする場合が多く、その他にも、尿、胃内容物、臓器、吐瀉物、口腔内付着物、体表付着物など多岐に亘る。しかしながら、我が国の裁判制度においては、薬毒物が吐瀉物や体表付着物などの体液以外から検出されたとしても、死者が薬毒物を摂取した証明にはならないとされている^{1,2}。したがって、必ず血液や尿など死体の体内から採取された生体試料を分析対象として薬毒物鑑定をしなくてはならない。ところが、血液や尿などの生体試料中の未知の薬毒物濃度が微量であることがあり、また摂取した薬毒物の特定に長い時間を要する場合がある。死因究明には正確性ととも迅速性が求められるため、薬毒物が高濃度に含有されている可能性が高い胃内容物や吐瀉物から薬毒物鑑定を実施し、分析対象を推定させることにより血液や尿の鑑定の一助とする必要がある。

1.1.2 薬毒物中毒の情勢

薬毒物の種類は、揮発性毒物、規制薬物、医薬品、農薬、天然毒、その他に大別される。薬毒物の中でも最も中毒件数が多いのが揮発性毒物に分類される一酸化炭素であり、全国で年間 3000 件を超える中毒事故のうちの約 7 割を占めている³。一酸化炭素中毒が急増し始めたのは 2003 年からであり、その理由はコンピューターが一般家庭に普及したことにより、インターネットを介して練炭による自殺方法が模倣されたことによる影響であると報告されている⁴。また、2008 年からは硫化水素による中毒事故が急増し、これもまたインターネットにより自殺方法が紹介されたことにより増加したと考えられた。そのため、硫化水素による自殺については、インターネットの規制や入浴剤等の販売を自粛するような措置がとられた⁵。

また、農薬による中毒事故件数は、昭和 61 年の 1716 件をピークにして近年減少傾向にあり、それに代わり医薬品が除々に増加し 2006 年には逆転している³。農薬中毒減少の理由としては、農業人口の減少や高齢化に伴い、農地が減少したことに起因すると考えられ、それに加えて農薬中毒の大半を占めていた高濃度パラコート製剤が規制されたことにより農薬中毒数が減少したと考えられた。また、医薬品中毒に関しては、社会情勢の変化により社会的ストレスを抱える人口が多くなったによる医薬品の過量服薬が原因の 1 つではないかと考えられた⁶。

その他、天然毒による中毒事故も少数ではあるが毎年発生しており、トリカブトによるアコニチン中毒⁷⁻¹²やバイケイソウによるペラトラムアルカロイド中毒^{13,14}、渦鞭毛藻を食した海洋生物によるシガテラ中毒¹⁵⁻¹⁷、アオブダイ等によるパリトキシン中毒¹⁸⁻²⁰、フグ等によるテトロドトキシン中毒²¹⁻²⁴等が報告されている。

1.1.3 薬毒物の分析法

上記のような薬毒物の分析方法は多岐に亘り、液体クロマトグラフィー (LC)、ガスクロマトグラフィー (GC) による分析、赤外や紫外可視等の分光光度計、元素分析計等がある。LC を分離原理として持つ機器は接続される検出器によってさまざまな種類があり、高速液体クロマトグラフ (HPLC)、高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS)、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置 (LC-MS/MS)、液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) 等が挙げられる。また、GC を分離原理として持つ機器も同様に、水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ (GC-FID)、炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ (GC-FPD)、フレイムサーミオニック検出器付ガスクロマトグラフ (GC-FTD)、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS)、ガスクロマトグラフタンデム質量分析装置 (GC-MS/MS) 等さまざまである。このうち、法医学の分野で広く一般的に用いられている分析機器は、LC-MS/MS と GC-MS である。どちらの分析機器もカラムクロマトグラフィーの原理により目的物質を分離し、質量分析部でイオン化し検出することは共通している。最も大きな違いは移動相であり、この違いにより感度良く測定可能な化学種が大きく異なる。GC-MS は試料導入部で試料をガス化させるため、揮発性の高い化合物には有効な分析手法であり、ベンゼンやトルエン等の低分子化合物^{25,26}やジメトエート²⁷、フェニトロチオン²⁸等の揮発性有機リン系毒物等が適している。LC-MS/MS は GC-MS とは反対に、アミノ基等のプロトン親和力の高い構造を持つ低揮発性化合物に対して有効であり、メタンフェタミン (覚せい剤)²⁹、メチルメトカチノン³⁰、コカイン³¹等の精神神経系薬物や三環系抗うつ薬^{32,33}等の催眠鎮静薬、アコニチン系アルカロイド^{34,35}やストリキニーネ³⁶等の天然毒等に対して高感度分析が可能である。また、LC-MS/MS はイオン化段階ではあまりフラグメンテーションを起こしづらく、カラムでの分離能が低いために、法医学の場面において未知試料を分析する際は最低でも 2 段階のイオン化が必要である。

1.2 薬毒物の抽出

1.2.1 液液抽出法

いくら分析機器が高性能であっても、法医学的試料を装置に導入する前には、なんらかの抽出操作が必要となる。最も一般的かつ原始的な薬毒物の抽出方法は、液液抽出法である。古くから知られている薬毒物の抽出方法に液液抽出法の一つである Stas-Otto 法がある³⁷。この方法は、1850 年に Jean-Servais Stas により植物からアルカロイドを抽出するために考案され、さらに 1856 年に Friedrich Julius Otto によってより純粋なアルカロイドを得られるように改良され、Stas-Otto 法として完成した³⁸。その後、薬毒物の一般抽出法として広く流通し、現在も基礎的な抽出方法として利用されている³⁹⁻⁴²。Stas-Otto 法を基盤として行われている抽出法の概要は次の通りである。まず、検体からエタノールまたはアセトンで抽出した液体について酸性および塩基性に液性を振り分けながらエーテルやクロロホルムで抽出する方法である⁴³。これにより強酸性薬毒物画分、中性薬毒物画分、弱塩基性薬毒物画分、強塩基性薬毒物画分、モルヒネ画分 (pH 9) に分けられ、それぞれの液性に合った薬毒物が分配される。

また、近年の法医学分野では上記のような純粋な液液抽出法に代わり、液液抽出法を基本原理に用いた QuEChERS 法⁴⁴⁻⁴⁶やケイソウ土カラム抽出法⁴⁷⁻⁴⁹が考案され、頻繁に利用されている。

1.2.2 固相抽出法

固相抽出法は、1970 年代後半にアメリカで開発された抽出方法で、化学結合型シリカ、ポリマーゲル、グラファイトカーボン等の担体を充填したカラムに試料を通液させ、試料中の薬毒物等の抽出・精製を行っていく手法である⁵⁰。固相抽出法は、迅速・簡便な抽出が可能であり、法医学、薬学等の分野で広く利用されている。液液抽出法との大きな違いは次の通りで、第一に使用する有機溶媒が少なくて済むということが挙げられる。したがって、環境負荷が小さいといえる。また、液液抽出ではサンプルによってはエマルジョンを形成してしまうことがあるが、固相抽出では液体中の分子と固体の間の相互作用を利用しているのでエマルジョンを形成しない。液液抽出では回収率が低い水溶性の高い薬毒物でも、イオン交換樹脂系の極性の高い固相を用いることで高い回収率が得られる。目的の物質に適した固相を選択することにより、クリーンアップ効果が液液抽出よりも一般的に高くなるといわれている。

固相の種類には主に、逆相（無極性）、順相（極性）、イオン交換相がある。中でも逆相系の固相は適用可能な薬毒物が最も多く、それゆえ法医学の分野ではよく使用されている。例えば、ヒト尿中の覚せい剤アンフェタミン類、麻薬 MDA 類の抽出^{51,52}、ヒト血清中の局所麻酔剤ジブカインおよび血管収縮剤ナファゾリンの同時抽出⁵³、ヒト体液中のパラコートおよびジクワットの抽出^{54,55}等、広範囲に亘り利用されている。また、それら以外にもさまざまな固相が考案されており、逆相系の固相とイオン交換系の固相を兼ね備えた混合相による抽出カートリッジも開発されている。混合相は、抽出目的物質が極性の官能基を持つならば、選択性の低い無極性の固相を用いるよりも、夾雑成分の影響を最小限に抑えることが可能であるため、法医学の分野でも逆相の固相抽出に次いで多く利用されている。例えば、血清中からのさまざまな睡眠薬の抽出⁵⁶、溶血からのゾピクロンおよびザレプロンの抽出⁵⁷、合成カチノン類およびフェネチルアミンの抽出⁵⁸、ヒト血漿および尿からの毒性アルカロイド（ブルシン、ストリキニーネ、アトロピン、アニソダミン、スコポラミン、アニソジン）の抽出⁵⁹等の混合相を用いた抽出方法が報告されている。

1.2.3 ヘッドスペース法

前述の液液抽出法や固相抽出法は薬毒物の抽出においては有用な手段であるが、揮発性の高い物質や気体試料への適用は困難である。一方で、ヘッドスペース法は、揮発性の高い化学物質の採取（抽出）に有効な方法である。ヘッドスペースとは、バイアル瓶等に液体または固体試料を入れ、密閉した際に上部に生じる気相部分を指し、ヘッドスペース法はヘッドスペース部分をガストイトシリンジで直接採取し、試料表面から気相内に揮発してきた分析種をそのまま GC に導入する方法である。容器の中の試料液体と気相中の分析種は、一定温度で一定時間以上保つことにより平衡状態に到達し、平衡状態時に試料から浸み出した分析種の気相中での濃度が最大になる。また、一般的に加温することにより気液平衡が崩れ、気相中の分析種濃度が増大する。

最近では、ヘッドスペース法の原理に基づいたさまざまな抽出方法が考案されており、真空中に引いておいたキャニスターと呼ばれるステンレス容器を用意し、圧力差を利用して気相を吸引するキャニスター法⁶⁰⁻⁶³、密閉した容器内で試料に不活性ガスを当てることにより揮発性物質を強制的に気化させ、その気相中の揮発性物質を捕集・濃縮を行うパージアンドトラップ法⁶⁴⁻⁶⁷、TENAX[®] TA と呼ばれる 2,6-ジフェニル-*p*-フェニレンオキシドをベースに持つポーラスポリマービーズにアルコール等の極性揮発性物質を吸着させ濃縮する方法⁶⁸⁻⁷¹、SPME (solid-phase microextraction) と呼ばれるマイクロシリンジのような装置を用い、その先端の固相に分析種を吸着または分配させる固相マイクロ抽出 (SPME) 法⁷²⁻⁷⁵、そして濃縮媒体 (固相) が充填された NeedlEx[®] と呼ばれる注射針型デバイスを用いて抽出する NeedlEx 濃縮法^{76,77} 等がある。

1.3 NeedleEx 濃縮法

NeedleEx (ニードレックス) 濃縮法は 2003 年に考案された新しい抽出方法で、濃縮媒体が充填された長さ約 10 cm のニードル形状をした NeedleEx[®]を用いて抽出する方法である⁷⁸。前述の 1.2.3 項の SPME 法は静的ヘッドスペース法であるのに対し、本法はパージアンドトラップ法と同様に動的（ダイナミック）ヘッドスペース法である。NeedleEx 濃縮法は気相の分子と固相の相互作用を基礎としており、NeedleEx[®]で気相を吸引することで、気相中の目的の化学種が選択的に固相に吸着され、抽出が可能となる（図 1）。固相に吸着された化学種は、GC や GC-MS で分析する際の注入口の熱により固相から脱離し、濃縮された化学種が GC または GC-MS 内部に注入される。

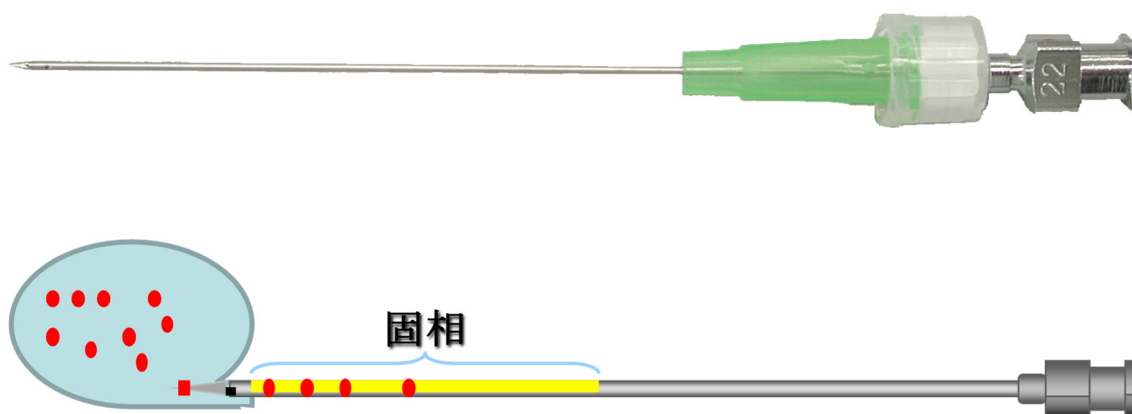


図 1. NeedleEx[®]の写真（上）および模式図（下）。

NeedleEx[®]内には固相が充填されており、固相はニードル内部を通過する気相との間で平衡状態となり、化学種の一部が固相に吸着する。吸引された気相は、ニードル先端の固相から接触するため、先端から順に固相が飽和し、固相の吸着能を超える濃度の気相を吸引するとすべての固相が飽和し、破過が起こる。有機溶媒の種類により固相-気相間の平衡定数が異なるため、それぞれの破過容

量も異なり、一般的に高沸点揮発性有機化合物ほど破過容量は大きくなる。一定濃度以下では、破過は化学種および吸引量に依存し、定量性は著しく低下する。

NeedlEx[®]はもともと環境分析用として考案され、現在では有機溶剤用、アルコール用、脂肪酸用、石油系炭化水素用、トリメチルアミン用等が開発されており、それぞれ注射針内に充填されている固相が異なっている。固相抽出は抽出と精製を行うことが可能であったが、NeedlEx 濃縮法は抽出、精製、濃縮を同時に行うことができ、さらにクリーンアップ効果が固相抽出よりも極めて高いという特徴がある。また、有機溶媒を一切使用しないため環境負荷がない。さらに、他のさまざまなヘッドスペース法と比較して煩雑な機器を使用せず、特別な習熟した操作を必要としないため、抽出が非常に迅速・簡便である。ただし、気相中の化合物のみが抽出対象であるため、揮発性物質のみしか適用できないことや、選択性が高いために NeedlEx[®]の種類の選択を誤ると目的物質が充填剤に吸着されない場合があることなどのデメリットもある。

NeedlEx[®]は 2005 年に石澤らによって初めて法科学に応用された⁷⁹。石澤らは毒物混入が疑われた清涼飲料水について NeedlEx 濃縮法を用い抽出して GC-MS で分析し、混入された毒物を特定した。これ以降、放火に使用される石油系燃料の抽出⁸⁰、クロルピクリン（催涙性毒ガス）の抽出⁸¹、アリルイソチオシアネートやクロロアセトフェノン等の催涙剤の抽出⁸²、プロパンチオールやメチルプロピルジスルフィド等の悪臭物質の抽出⁸³、塩化メチレンやベンゼン等の有害物質の抽出⁸⁴に利用されている。しかしながら、NeedlEx[®]がヒト体液試料に応用されたという報告は、膀胱癌患者の尿中の臭気の抽出⁸⁵の一報のみであり、血液等の法医学的試料からの毒性物質の抽出の報告は未だになされていない。

1.4 本研究の目的

法医学における分析業務においては、速やかな死因の究明、毒物の特定等が求められ、そのための新規鑑定手法の確立が常に追求されている。

毒物の一種であるカルバメートは熱分解性を持つために、GC-MS による分析の際に一部が分解して定量性が低下する課題がある。また、血液や尿試料からの抽出の際には、血液や尿由来の夾雑物が目的の薬毒物と同時に抽出され、分析を妨害することが起こり得る。これらの問題を解決するために、カルバメートを前処理の段階で誘導体化し、熱耐性および揮発性を向上させ、NeedlEx[®]による抽出を行った。これにより、カルバメートの熱分解性を抑制させ、夾雑物の回収率を最小限に抑えた上で、NeedlEx[®]による簡便かつ選択的な分析手法の確立を目指した。

また、火災時に建材等が燃焼して発生する一酸化炭素やシアン化水素以外の揮発性物質は、生前焼死を証明する有効なツールであるが、焼死体の血液中に取り込まれる量が極微量であり、これまでのヘッドスペース分析では検出が極めて困難である。このため、揮発性化合物の抽出および濃縮に有利な NeedlEx[®]を活用し、焼死体血液中の燃焼由来の揮発性物質 (combustion-derived volatile substances, CVSs) の抽出を行った。これにより、従来不可能であった CVSs を利用した生前焼死の証明および焼死のより詳細な原因究明を可能とすることを目指した。

本研究により、これまで難解であった種々の死因究明に対して、より簡便かつ迅速な分析手法を確立し、毒物鑑定の進歩に貢献することができる。

第2章 体液試料からのカルバメートの分析へのNeedlEx[®]の応用

2.1 序論

カルバメートは農薬として広く利用されている。しかし、入手しやすいことと毒性が高いことを利用し、自殺の手段に使用されることがあり、カルバメート系農薬による中毒事故もいくつか報告されている⁸⁶⁻⁹⁰。体液試料からのカルバメート系農薬の抽出および分析はいくつか報告があるが^{91,92}、血液等からの抽出において生体試料由来の夾雑物まで多く抽出してしまうことや、カルバメート化合物に熱分解性があるためにGC-MSによる分析の際に一部あるいはすべてが熱分解してしまうという問題点があった。このような課題を解決するために、カルバメートの前処理として誘導体化を行い、熱耐性を向上させる必要があると考えられた。誘導体化には、クロロギ酸メチル^{93,94}を用いた。クロロギ酸メチルは、熱や酸に不安定な物質の誘導体化として推奨されている上に、誘導体化試薬の中でも稀な水溶液中でも反応が進行することにより、熱分解問題の解決策として期待できる。

また、生体試料由来の夾雑物とカルバメートを完全に分離するために液液抽出や固相抽出ではなくダイナミックヘッドスペース法的一种であるNeedlEx濃縮法を用いることができれば、分離が可能になると考えられるが、カルバメートは揮発性が低くそのままの状態ではNeedlEx[®]を適用できない。そこで、誘導体化処理時に熱耐性だけでなく揮発性も向上させることができる誘導体化を行うことで、2つの課題が解決されることが考えられた。

本研究ではカルバメートの熱分解を防止するために誘導体化処理を行った後、誘導体化カルバメートのみを選択的にNeedlEx[®]で抽出・濃縮して分析するという方法を確立させ、実務に適用可能かどうか検討を行った。

2.2 実験材料と方法

2.2.1 試薬と材料

本研究では7種類のカルバメートを対象とした(図2)。

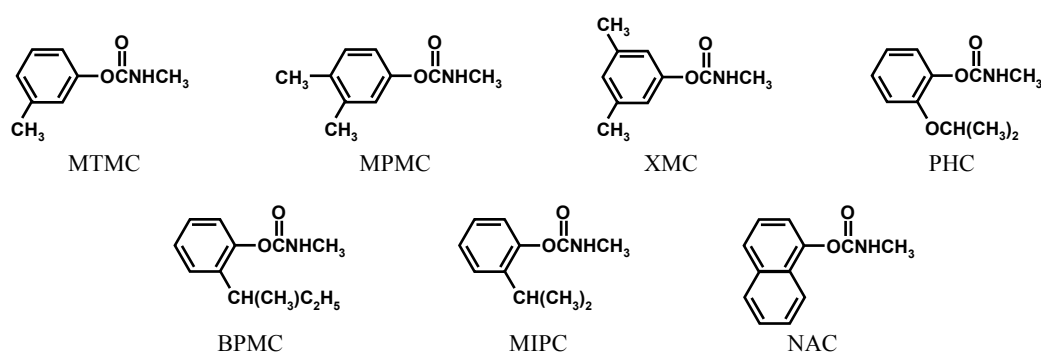


図2. 分析対象としたカルバメート

m-tolylmethylcarbamate (MTMC)、*o*-cumenyl methylcarbamate (MIPC)、3,4-xylyl methylcarbamate (MPMC)、3,5-xylyl methylcarbamate (XMC)、2-*sec*-butylphenyl methylcarbamate (BPMC)、2-isopropoxyphenyl methylcarbamate (PHC)、1-naphthyl methylcarbamate (NAC)、phenol (内部標準物質、I.S.)、クロロギ酸メチルは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。各カルバメートの標準溶液は (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 20% (v/v; ethanol/water) エタノール水溶液となるように調製した。標準ヒト血清は Jackson Immuno Research, Inc. (PA, USA) から購入した。尿試料は健常人より採取した。

NeedlEx[®]はカルバメートを選択的に吸着させるようにジビニルベンゼン型ポリマーを充てんしたものを Shinwa Chemical Industries (Kyoto, Japan) と共同で試作した。NeedlEx[®]に接続する北川式吸引ポンプ (AP-20) は Komyo Rikagaku Kogyo K.K. (Kanagawa, Japan) から購入した。

2.2.2 サンプル調製

尿または血清にカルバメート標準溶液を添加し、模擬試料を作成した。カルバメート添加尿または血清 1 ml に 0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml をバイアル瓶内で混合し、室温で 5 分間静置して加水分解処理を行った。次に一定量のクロロギ酸メチルおよび 1.5 M 炭酸緩衝液 (pH 9.3) 1 ml を添加してバイアル瓶を密閉した。軽く攪拌後、10 分間室温で静置して誘導体化処理を行った (図 3)。吸引ポンプを接続した NeedleEx[®] をバイアル瓶のヘッドスペース部分に挿入し、100 ml 分を吸引した。吸引後、NeedleEx[®] をガスタイトシリンジに付け替え、GC-MS の注入口に挿入した。NeedleEx[®] を挿入した状態で 10 秒間保持した後に、NeedleEx[®] 内に捕集された誘導体化カルバメートを GC-MS に注入した。

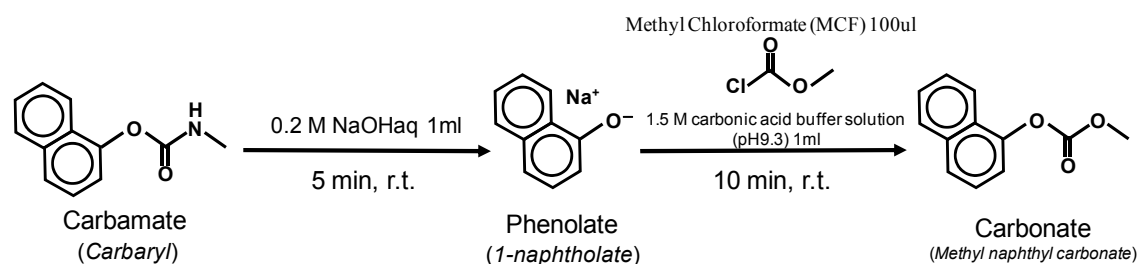


図 3. カルバメートの加水分解および誘導体化

2.2.3 GC-MS 分析条件

GC-MS は Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu Co., Ltd., Kyoto, Japan) を使用し、Electron ionization mode で作動させた。カラムは InertCap[®] 1MS capillary column (20 m × 0.18 mm i.d.; film thickness, 0.18 μm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を装着した。また、動作条件は以下の通りである。

注入口温度 ; 250°C

インターフェース温度 ; 250°C

イオン源温度 ; 250°C

キャリアガス ; 高純度ヘリウム

流量 ; 0.96 ml/min

カラムオーブン昇温条件 ; 70°C (1 分) -10°C/min (150°Cまで) -25°C/min (250°Cまで) -250°C (5min)

スプリット比 ; 1:100

イオン化エネルギー ; 70 eV

2.3 結果

2.3.1 加水分解の反応条件の最適化

まず、カルバメートの加水分解が完了する反応時間を調査した。NAC 水溶液および内部標準物質 (I.S.) フェノールをバイアル瓶に入れ平衡状態とした後、大過剰濃度 (1 M) の水酸化ナトリウム水溶液 1 ml を添加し、カルバメートが最大ピーク面積値を取る時間を求めた (図 4 上)。カルバメートの加水分解反応は速やかに進行し、5 分でプラトーに達することが明らかとなった。次に、NAC 水溶液および I.S. のフェノールをバイアル瓶に入れ平衡状態とした後、特定の濃度の水酸化ナトリウム水溶液 1 ml を添加してから 5 分間静置し、カルバメートが最大ピーク面積値を取る水酸化ナトリウム水溶液濃度を求めた (図 4 下)。その結果、水酸化ナトリウム水溶液濃度が 0.2 M のときにプラトーに達することが明らかとなった。

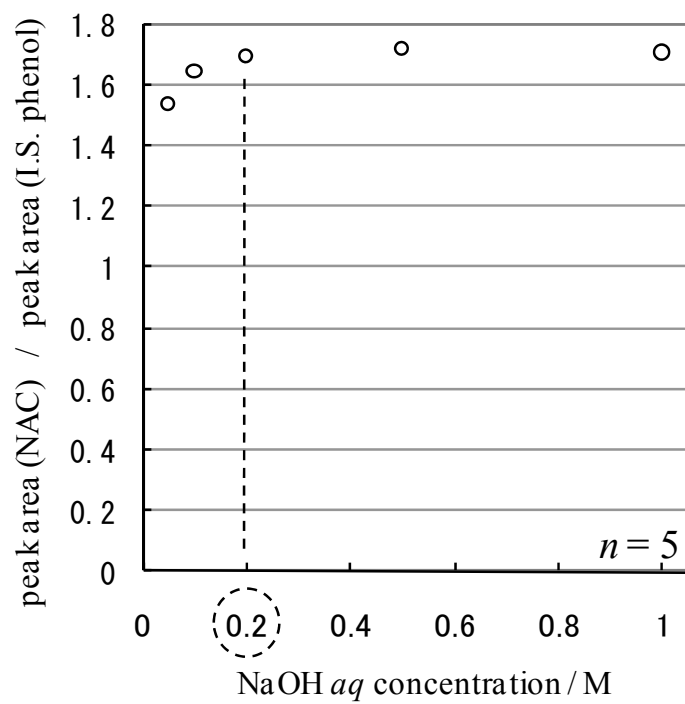
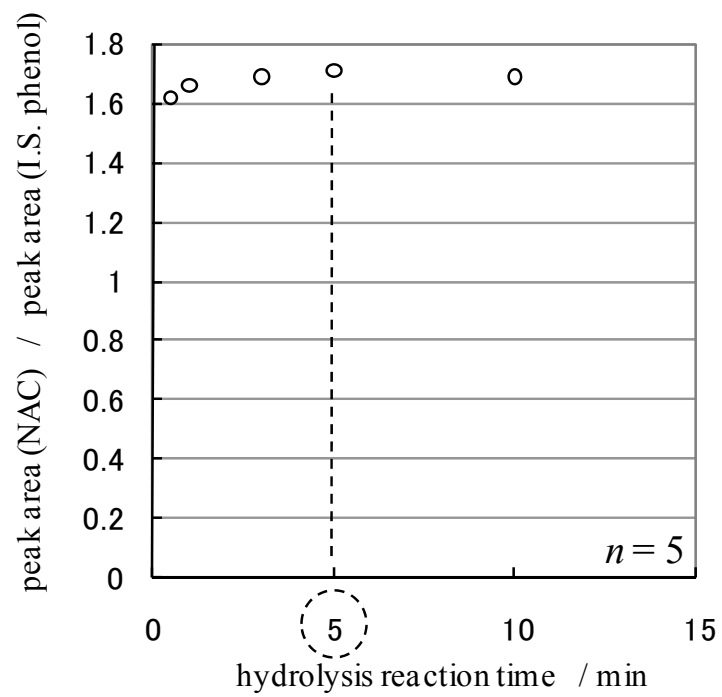


図 4. カルバメート (NAC) の加水分解反応時間 (上) および水酸化ナトリウム濃度 (下) の検討

2.3.2 クロロギ酸メチルによる誘導体化条件の最適化

異なる体積のクロロギ酸メチル (60, 80, 100, 120 μ l) および 1.5 M 炭酸バッファ (pH 9.3) (0, 1, 2 ml) を用いて、最適な誘導体化条件を調査した。各体積のクロロギ酸メチルと 1.5 M 炭酸バッファ (pH 9.3) を加水分解後の NAC 試料に添加し、誘導体化を行った結果を図 5 に示す。検出された誘導体化 NAC のピークの面積値は、添加したクロロギ酸メチルの量およびバッファの量に大きく依存し、クロロギ酸メチル 100 μ l、1.5 M 炭酸バッファ 1 ml 添加した時に最大ピーク面積値を示した。

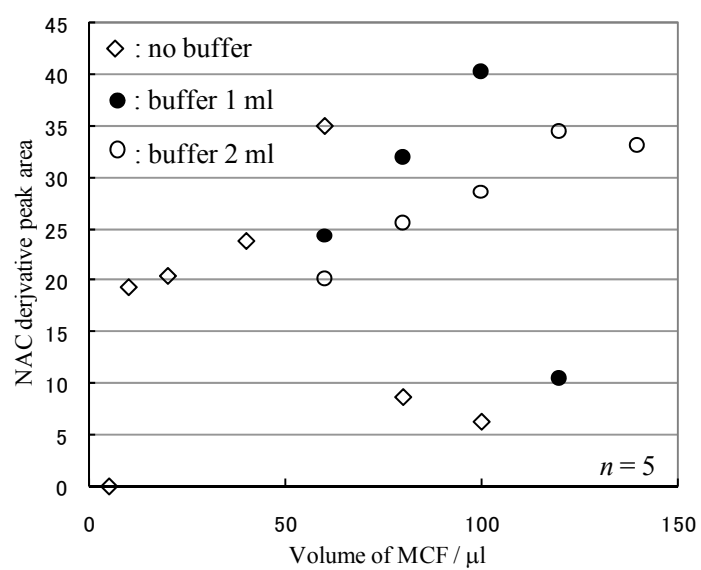


図 5. カルバメート (NAC) の誘導体化における最適なクロロギ酸メチル (MCF) の量および 1.5 M 炭酸バッファの量の検討。

2.3.3 誘導体化カルバメートのクロマトグラム

尿および血清から抽出したカルバメート誘導体を GC-MS により分析した結果得られたクロマトグラムをそれぞれ図 6 A および C に示す。陰性対照試料として、ブランク尿およびブランク血清から抽出し分析した結果得られたクロマトグラムを図 6 B および D に示す。カルバメート標準溶液のクロマトグラムを図 6 E に示す。なお、誘導体化していないカルバメートは揮発性が極めて低く、NeedlEx[®]による抽出が不可能であったため、カルバメート標準溶液の液体を直接 GC-MS に導入して分析を行い、その結果を誘導体化カルバメートと比較した。カルバメート標準溶液のクロマトグラムでは、MTMC、MIPC、XMC、MPMC、PHC、BPMC、NAC に対応するピークがそれぞれ保持時間 9.3、10.2、10.3、10.6、10.7、10.7、12.5 分に観測された。PHC と BPMC に由来するピークのオーバーラップが確認された。カルバメート誘導体のクロマトグラムでは、MTMC、MIPC、XMC、MPMC、BPMC、PHC、NAC の誘導体化物に由来するピークがそれぞれ保持時間 6.6、7.8、8.0、8.5、8.8、8.9、11.1 分に観測され、PHC と BPMC のオーバーラップを解消することができた。また、尿または血清由来の夾雑物はほとんど抽出されておらず、目的のカルバメート誘導体のみが抽出されていることが確認できた。熱による誘導体化カルバメートの分解は一切確認されなかった。

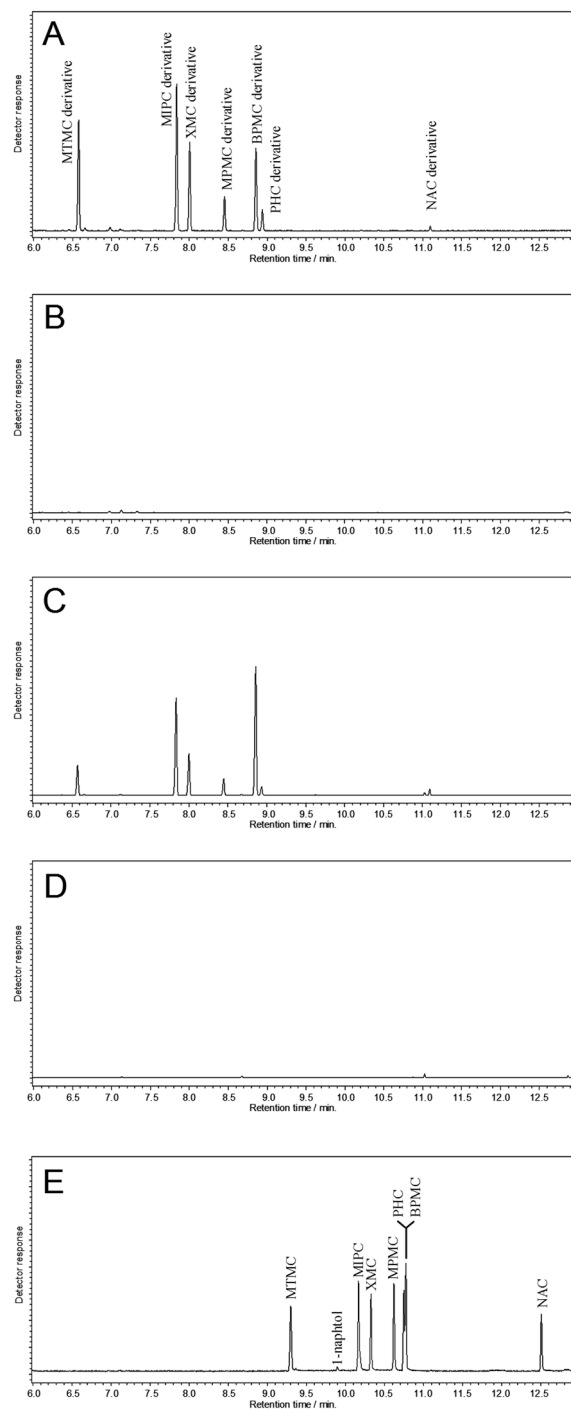


図6. A: カルバメート添加尿、B: ブランク尿（陰性対照）、C: カルバメート添加血清、D: ブランク血清（陰性対照）に誘導体化処理を行い、NeedlEx[®]により抽出し GC-MS で分析した結果得られたクロマトグラム、および E: カルバメート標準溶液を直接 GC-MS で分析した結果得られたクロマトグラム。

2.3.4 誘導体化カルバメートのマススペクトル

GC/MS の分析により得られた誘導体化していないカルバメートのマススペクトルを図 7 A から G に、誘導体化したカルバメートのマススペクトルを図 7 A' から G' に示す。誘導体化する前のカルバメートのマススペクトルからは NAC 以外の分子イオンピーク (M^+) は観測されなかった。分子イオンピークは化合物の分子量を反映するため、分子量を見積もる上で重要な指標である。一方で誘導体化カルバメートのマススペクトルからはすべての分子イオンピークが観測された。すべてのカルバメートは誘導体化することにより分子量が 1 だけ増加するので、NAC に着目すると誘導体化 NAC はマススペクトルから観測された分子イオンピークが m/z 201 から m/z 202 へ 1 増加していることが確認できた。また、いずれのカルバメートも誘導体化前後でフラグメントイオンを比較すると、誘導体化後にフラグメントイオンの数が増加した。これにより非常に類似した EI マススペクトルを示していた XMC (図 7 C) と MPMC (図 7 D) が、誘導体化後の XMC (図 7 C') では m/z 136 のフラグメントイオンが増え、ベースピークが m/z 91 となり、誘導体化後の MPMC (図 7 D') では m/z 135 のフラグメントイオンが増え、ベースピークが m/z 121 となったことにより明らかに異なる EI マススペクトルに変化した。これにより、従来の GC-MS 分析では識別が困難であった異性体の関係にある XMC と MPMC が誘導体化することにより EI マススペクトルで明確に区別が可能となった。

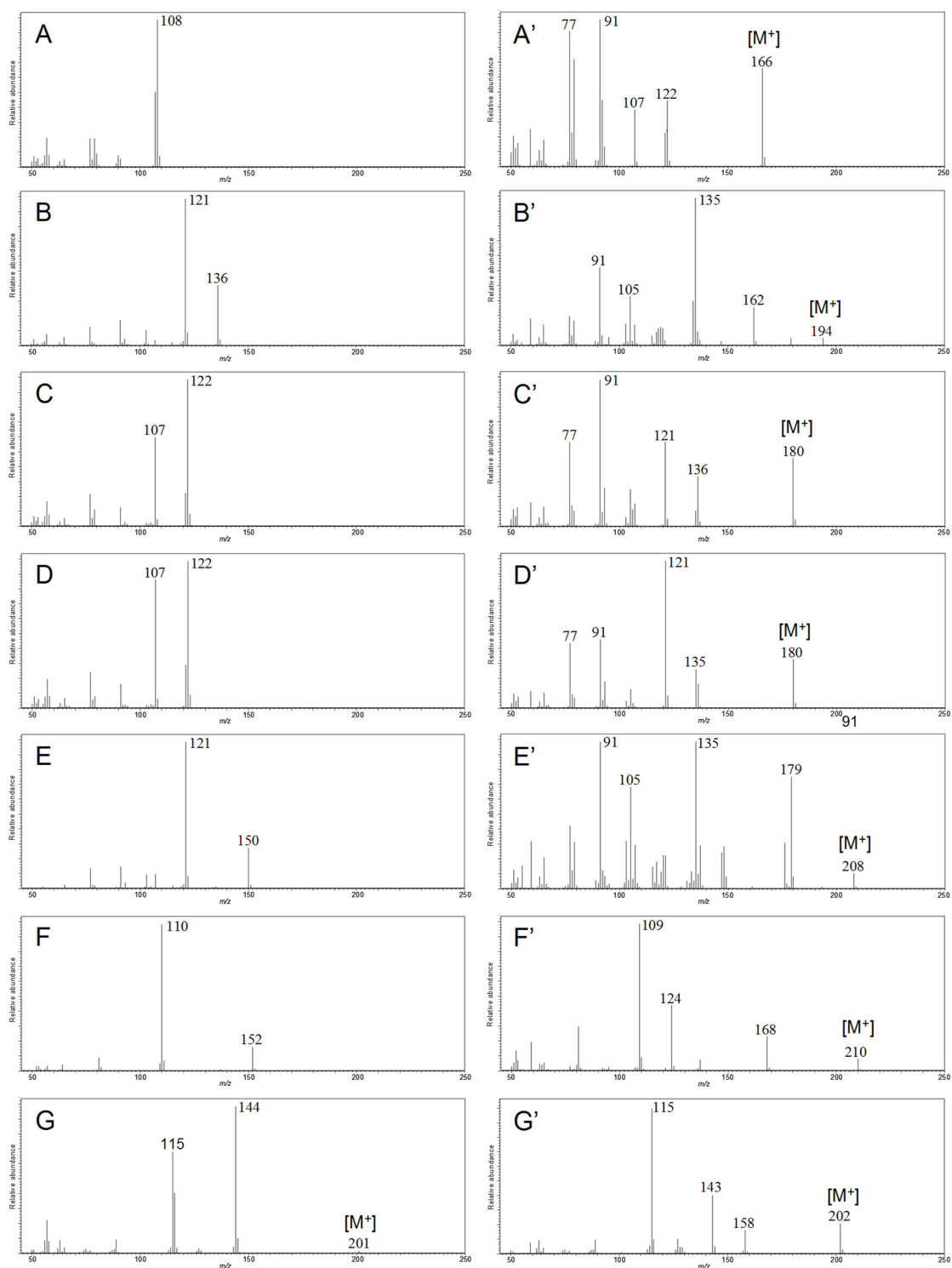


図 7. A: MTMC、B: MIPC、C: XMC、D: MPMC、E: BPMC、F: PHC、G: NAC の EI マススペクトル、および A' から G' はそれぞれ対応する誘導体化カルバメートの EI マススペクトル。

2.3.5 誘導体化カルバメート分析における検量線、検出限界、精度

誘導体化カルバメートの GC/MS 分析における定量性を確認するために検量線作成を行った。尿試料から抽出の検量線を図 8、血清試料から抽出の検量線を図 9 に示す。すべての検量線で高い相関が得られ、いずれの相関係数も 0.99 を上回る結果であった（表 1 および 2）。

また、各誘導体化カルバメートの本方法における検出限界を求めた。検出限界は、フルスキャンモードでシグナルがノイズ幅の 3 倍以上と定義した。尿試料からの抽出では各検出限界が、誘導体化 MTMC が 0.1 µg/ml、誘導体化 MPMC が 0.5 µg/ml、誘導体化 XMC が 0.1 µg/ml、誘導体化 MIPC が 0.05 µg/ml、誘導体化 PHC が 0.5 µg/ml、誘導体化 BPMC が 0.05 µg/ml、誘導体化 NAC が 0.5 µg/ml であった。血清試料からの抽出では誘導体化 MTMC が 0.5 µg/ml、誘導体化 MPMC が 0.5 µg/ml、誘導体化 XMC が 0.5 µg/ml、誘導体化 MIPC が 0.5 µg/ml、誘導体化 PHC が 1.0 µg/ml、誘導体化 BPMC が 0.5 µg/ml、誘導体化 NAC が 5.0 µg/ml であった。

また、分析手法の精度（日内変動）を見積もるために、各誘導体化カルバメートの各濃度における相対標準偏差（RSD, %）を算出した。尿試料では 1、5、10、20 µg/ml の濃度における RSD、血清試料では 5、10、20 µg/ml の濃度における RSD を計算した結果、すべての条件において RSD が 10%以下となり、再現性のある精度の高い分析手法であることが証明された（表 3）。

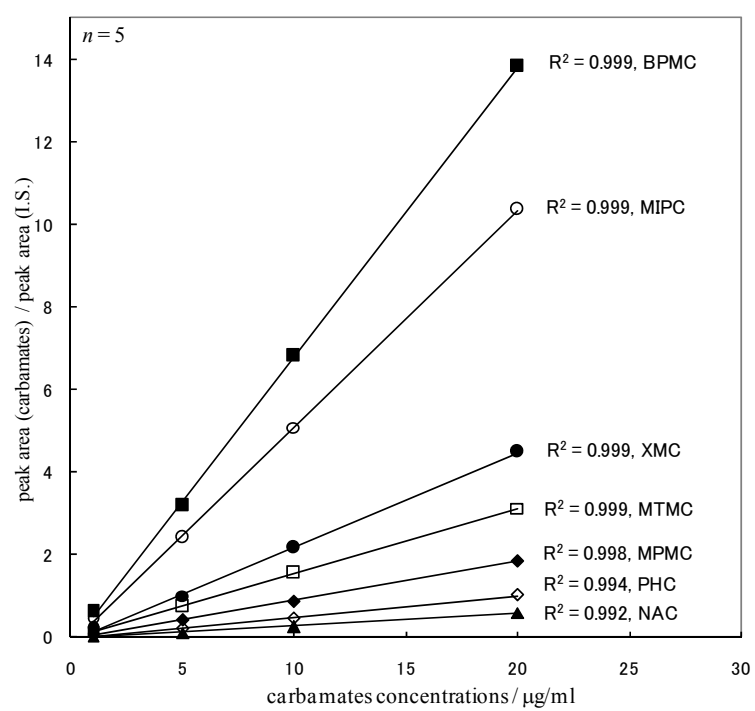


図 8. 尿試料から回収した誘導体化カルバメートによる検量線

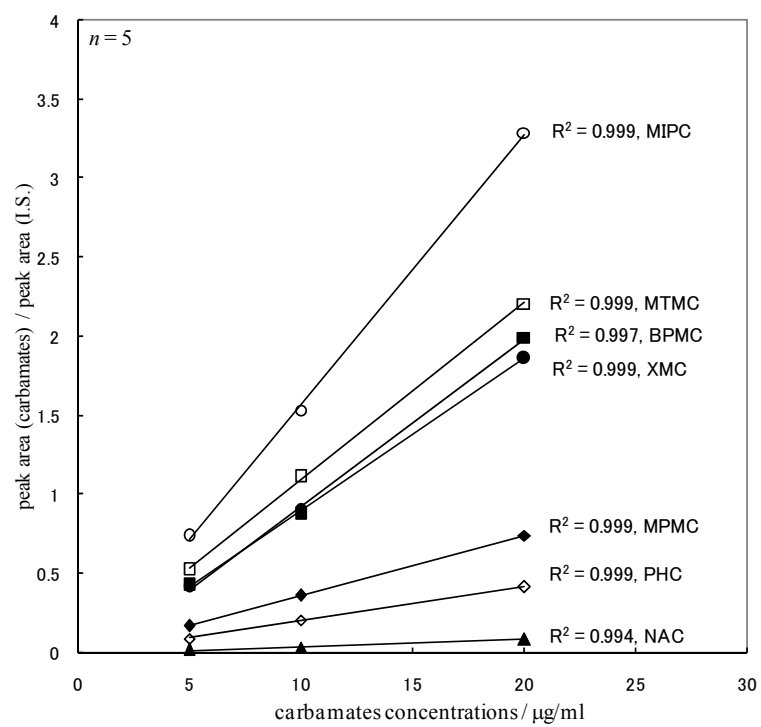


図 9. 血清試料から回収した誘導体化カルバメートによる検量線

表 1．尿試料から回収した誘導体化カルバメートの検出限界（LOD）、および検量線パラメータ

Compounds	LOD (μg/ml)	Linearity ^a	Range of linearity (μg/ml)	Correlation coefficient
MTMC derivative	0.1	$y = 0.1572x - 0.0316$	1-20	0.999
MPMC derivative	0.5	$y = 0.0938x - 0.0517$	1-20	0.998
XMC derivative	0.1	$y = 0.2276x - 0.0966$	1-20	0.999
MIPC derivative	0.05	$y = 0.5225x - 0.1347$	1-20	0.999
PHC derivative	0.5	$y = 0.0514x - 0.0444$	1-20	0.994
BPMC derivative	0.05	$y = 0.6997x - 0.1962$	1-20	0.999
NAC derivative	0.5	$y = 0.0307x - 0.038$	1-20	0.992

^a x axis is the concentration of carbamate derivatives (μg/ml), and y axis is the peak area ratio.

表 2. 血清試料から回収した誘導体化カルバメートの検出限界 (LOD)、および
検量線パラメータ

Compounds	LOD (μg/ml)	Linearity	Range of linearity (μg/ml)	Correlation coefficient
MTMC derivative	0.5	$y = 0.1119x - 0.0234$	5-20	0.999
MPMC derivative	0.5	$y = 0.0385x - 0.0269$	5-20	0.999
XMC derivative	0.5	$y = 0.0966x - 0.0693$	5-20	0.999
MIPC derivative	0.5	$y = 0.1711x - 0.1413$	5-20	0.999
PHC derivative	1	$y = 0.0217x - 0.0155$	5-20	0.999
BPMC derivative	0.5	$y = 0.1057x - 0.1354$	5-20	0.997
NAC derivative	5	$y = 0.0046x - 0.0079$	5-20	0.994

表 3. 尿試料および血清試料から回収した誘導体化カルバメートの各濃度における相対標準偏差 (RSD,%)

Compounds	Intraday precision (RSD ^b %, n=5)						
	Urine				Serum		
	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
MTMC derivative	0.84	0.57	0.42	1.09	3.05	4.12	2.19
MPMC derivative	2.39	2.16	1.43	3.70	4.26	4.27	3.40
XMC derivative	1.75	1.45	1.05	3.43	4.01	4.97	3.67
MIPC derivative	1.62	0.82	0.65	4.29	4.37	5.58	4.04
PHC derivative	2.67	5.03	2.63	5.36	4.48	5.64	3.20
BPMC derivative	2.15	1.71	1.43	5.94	4.83	6.33	4.59
NAC derivative	3.78	6.32	3.04	2.76	7.35	8.77	5.70

^b RSD : relative standard deviation

2.4 考察

2.4.1 クロロギ酸メチルによる誘導体化条件の最適化

2.3.2 項図 5 では、クロロギ酸メチル添加量が増加する毎に得られる誘導体化カルバメート量も増大して一定添加量以上でプラトーに達すると予想されたが、一定量以上のクロロギ酸メチルを添加すると誘導体化率が減少するという現象が確認された。この現象は 1.5 M 炭酸バッファの量が 0、1、2 ml のいずれでも確認された。バッファを加えた理由としては、クロロギ酸メチルが弱塩基性条件下で反応が進行しやすいことが報告されているためである⁹⁴。しかしながら、各溶液の反応後の液性を確認したところ、過剰にクロロギ酸メチルを添加してしまうことにより強酸性側に偏っていることが確認された。クロロギ酸メチルの反応後に副生成物として発生した塩酸の効果によりバッファの緩衝能を超えて強酸性側に傾き、反応が抑制されたと考えられた。また、緩衝能を上げるために 2 ml のバッファを添加した場合には、クロロギ酸メチルの各添加量における誘導体化率の差は減少したが、最大の誘導体化率はバッファ 1 ml のときよりも低下した。この理由としては、実際には最大誘導体化率ときの最終的な液性が中性（または弱酸性）に変化していたことが起因していると考えられた。誘導体化後のカルバメートも加水分解を受ける炭酸エステル構造を有しており、相互に反応が進行するために、反応開始時に弱塩基性で、一定時間後に中性付近に変化することで逆反応を回避できたのではないかと考えられた。上記のような複数の因子が拮抗し、1.5 M 炭酸バッファ 1 ml およびクロロギ酸メチル 100 μ l のときに最大に誘導体化反応を進行させることができたと考えられた。

2.4.2 誘導体化カルバメートの GC-MS 分析結果

誘導体化後の分析では、分離能が向上した上に、すべてのカルバメートで保持時間の短縮に成功した。保持時間の短縮は迅速分析を行う上で重要であるが、分離能と保持時間の両立は難しいとされる。両者とも改善できた理由としては、カルバメート構造から誘導体化を行った後にカルボナート（炭酸エステル）構造になったために、その部分の極性が変化し、無極性カラム内膜とカルバメートの相互作用により各化合物間で差が増大したと考えられた。また、熱によるカルバメート類の分解物であるフェノール類は観察されなかった。従来では、GC-MS の注入口に注入したと同時に分解反応が開始し、カラム上で2つのピークとして観察される場合があったが、本方法では観察されなかったことで熱の耐性が向上したことが明らかとなった。

EI マススペクトルにおいて分子イオンピークが明確に観測されるように改善された理由としては、誘導体化により、熱等により脱離しやすかったカルバメートのカルバモイル基部分がカルボナート構造に変化したためであると考えられた。つまり、カルバメート構造からカルボナート構造に変化したことにより、EI のフラグメンテーションを受けにくい構造になったと考えられた。マス解析においてフラグメントイオンは化合物の構造情報を知る上で非常に重要なパラメータであるため、マス解析における構造の推定に大いに活用できると考えられた。

2.5 結論

カルバメート系農薬を NeedleEx[®]により抽出し、GC-MS で実用的に分析できる手法を開発した。本分析法は、まずカルバメート含有の血清または尿に試薬類を直接添加してカルバメートの加水分解および誘導体化を行い、その後 NeedleEx[®]により抽出し、GC-MS で分析する方法であり、検査に要する実時間は、前処理工程で約 25 分、分析工程で約 15 分であった。

本来カルバメートは揮発性を持たないため NeedleEx[®]では抽出が不可能であったが、クロロギ酸メチルによる誘導体化処理を施すことによって揮発性を高め抽出することが可能となった。NeedleEx[®]は非常に選択性の高い抽出デバイスであることから、従来の抽出法では分離が不可能であった尿や血清由来の夾雑物はまったく抽出せずに、誘導体化カルバメートのみを選択的に抽出することができた。そのため、分析の結果得られたクロマトグラムには尿や血清由来の夾雑物がまったく確認されず、誘導体化カルバメートのピークのみが観測された。したがって、従来の分析手法では、尿や血清の夾雑物に目的のカルバメートピークが埋もれてしまう問題があったが、本分析手法により改善されることが明らかとなった。また、マススペクトル上で観測され難かったカルバメートの分子イオンピークが、誘導体化することによりすべての誘導体化カルバメートで明確に観測することができ、さらに特徴的なフラグメントイオンも増加したために同定能力が向上した。

第3章 焼死体血液からの燃焼由来物質（CVSs）の分析への NeedlEx[®]の応用

3.1 序論

焼死を診断する上で重要な因子は、生前に熱気を吸入したことを示唆する気道熱傷が観察されること、気道上の煤が確認されること、体表の炭化を免れた部分に熱気による軽度の火傷（生活反応）が観察されること、火災以外の損傷やその他の疾患が確認されないことが挙げられる。また、この他にも毒物学的な観点から、血液中の一酸化炭素ヘモグロビン（COHb）飽和度が10%より高い数値を示すことや血液中シアン化物濃度が0.25 µg/ml以上であれば焼死を強く支持する結果であるといえる⁹⁵。また、血液中COHb飽和度が60%以上、もしくは血液中シアン化物濃度が3.0µg/ml以上であれば、それら単独で重要な致死因子である。しかしながら、すべての解剖所見が必ずしも揃うとは限らない。例えば、焼死の剖検例で、血液中COHb飽和度が10%以下であったことが報告されている⁹⁶。このようなケースでは、血液中COHb飽和度に比例して血液中シアン化物濃度も低い値を示し^{97,98}、毒物学的所見が失われる場合がある。

一方、火災時に発生するCVSsは一酸化炭素（CO）やシアン化水素だけではなく、家具や建物の燃焼により様々な化合物が発生することが知られており⁹⁹、新たな毒物学的所見として利用できる可能性を秘めている。また、発生するSVCsの種類は燃焼する物質に依存するため、焼死体からSVCsをスクリーニング分析することは、焼死時の周囲環境を推定することを可能にさせる。周囲環境を推定することは従来の解剖所見からはできなかったため、非常に価値があると考えられる。しかしながら、焼死体の血液中CVSs濃度は非常に低いと予想されるため¹⁰⁰⁻¹⁰²、CVSsを濃縮してから分析する必要がある。

そこで、本研究では焼死体の血液中の微量のCVSsをNeedlEx[®]を用いて濃縮し、GC-MSで分析し、実用可能な分析方法となり得るかどうか検討した。

3.2 実験材料と方法

3.2.1 試薬と材料

以下の標準試薬は焼死体血液中の CVSs の成分の同定のために使用した。

ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、ドデカン、トリデカン、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、プロピオニトリル、ピリジン、ベンゼン、トルエン、ベンゾニトリル、スチレン、エチルベンゼン、*o*-キシレン、*m*-キシレン、*p*-キシレン、インデン、 α -メチルスチレン、1,2,3-トリメチルベンゼン、1,2,4-トリメチルベンゼン、1,3,5-トリメチルベンゼン、プロピルベンゼン、ナフタレン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)

ピロール、フェニルアセチレン、2-エチルトルエン、3-エチルトルエン、4-エチルトルエン、1,2-ジクロロベンゼン、1,3-ジクロロベンゼン、1,4-ジクロロベンゼン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA)

2,3-ベンゾフラン、2-メチルスチレン、3-メチルスチレン、4-メチルスチレン、1-エチル-2-メチルベンゼン、1-エチル-3-メチルベンゼン、1-エチル-4-メチルベンゼン (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)

灯油スタンダード (Super Viva Home do-it-yourself store, Saitama, Japan) およびガソリン (レギュラー) スタンダード (ENEOS gas station, JX Nippon Oil & Energy Corporation, Tokyo, Japan) は助燃剤を使用した焼身自殺者の血液中の石油成分と比較するために使用した。

NeedlEx[®] (fire probe タイプ) は Shinwa Chemical Industries (Kyoto, Japan) から購入した。NeedlEx[®]に接続する北川式吸引ポンプ (AP-20) は Komyo Rikagaku Kogyo K.K. (Kanagawa, Japan) から購入した。

陰性対照として用いた標準ヒト血液は KOJIN BIO (Saitama, Japan) より購入した。

また、本研究では、2013 年から 2015 年の茨城県において火災により焼死した死体 61 検体を対象とした。61 検体を 4 つの区分に分類し、36 検体が建物火災による焼死者、17 検体が灯油を用いた焼身自殺者、6 検体がガソリンを用いた焼身自殺者、2 検体が屋外での焼死者とした。これら 61 検体の血液中の CVSs、

COHb 飽和度、シアン化物濃度を測定し、焼死の 4 区分における測定値の比較検討を行った。

なお、血液は心臓より採取し、司法解剖の一環として本検査を行った。

3.2.2 サンプル調製

焼死体の血液、もしくは陰性対照血液 3 ml を 25 ml 容量のバイアル瓶に入れ、密閉し、室温で 5 分間静置した。吸引ポンプを接続した NeedleEx[®]をバイアル瓶のヘッドスペース部分に挿入し、100 ml 分を吸引した。吸引後、NeedleEx[®]をガスタイトシリンジに付け替え、GC-MS の注入口に挿入した。NeedleEx[®]を挿入した状態で 10 秒間保持した後に、NeedleEx[®]内に捕集された CVSs を GC-MS に注入した。

焼死体周辺の燃焼残渣はチャック付きプラスチック袋に入れ、室温で 5 分間静置した後、上記と同様の操作を行い、CVSs の分析を行った。

灯油スタンダードおよびガソリンスタンダードはバイアル瓶に 1 μ l 滴下し、室温で 5 分間静置した後、上記と同様の操作を行い、石油成分の分析を行った。

3.2.3 GC-MS 分析条件

GC-MS は Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu Co., Ltd., Kyoto, Japan) を使用し、Electron ionization mode で作動させた。カラムは InertCap[®]1MS capillary column (20 m × 0.18 mm i.d.; film thickness, 0.18 μm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を装着した。また、動作条件は以下の通りである。

注入口温度 ; 250°C

インターフェース温度 ; 250°C

イオン源温度 ; 250°C

キャリアガス ; 高純度ヘリウム

流量 ; 0.87 ml/min

カラムオーブン昇温条件 ; 40°C (1 分) – 20°C/min – 250°C (0.5min)

スプリット比 ; 1 : 50

イオン化エネルギー ; 70 eV

3.2.4 焼死体血液中の COHb 飽和度およびシアン化物濃度の測定

血液中 COHb 飽和度の測定は Ishizawa の方法に従って行った¹⁰³。すなわち、血液を 0.1 %炭酸ナトリウム水溶液で希釈した後、少量のヒドロサルファイトナトリウムを添加し、419 nm と 425 nm の吸光度を測定して得られた吸光度比から COHb 飽和度を算出した。装置は V-630 spectrophotometer (JASCO Corporation, Tokyo, Japan)を使用した。

血液中シアン化物濃度の測定は Darr らの方法に従って行った¹⁰⁴。すなわち、血液 0.5 ml を 15 ml 容量のセプタム付きスクリーキャップタイプのバイアル瓶に入れ、1 M アスコルビン酸水溶液 0.03 ml および超純水 0.27 ml を添加した。密閉後、シリンジでセプタム部分を通して 50%リン酸 0.2 ml を添加し、攪拌した。バイアル瓶を 30 分間 50°C で加熱し、バイアル瓶のヘッドスペース部分をガスタイトシリンジで 0.25 ml 採取し FTD 検出器付きガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-2010) の注入口に注入した。

3.2.5 統計分析

血液中 CVSs、COHb 飽和度、シアン化物濃度の間の相関を調べるためにピアソンの積率相関分析を行った。ピアソンの積率相関係数 r の解釈は以下の表 4 の通りである。

表 4. ピアソンの積率相関係数の解釈 ($-1.0 < r < 1.0$ 、
正の数は正の相関、負の数は負の相関を示す)。

coefficient, r	strength of association
0	no correlation
$0 < r \leq 0.2$	almost no correlation
$0.2 < r \leq 0.4$	weak correlation
$0.4 < r \leq 0.7$	correlation
$0.7 < r < 1.0$	strong correlation
1.0 or -1.0	perfect correlation

また、焼死体の気道に付着した煤の量と血液中 CVSs の相関性を見積もるために p 値を用いた。 $p < 0.05$ のとき、統計学的有意差があると判断した。

3.3 結果

3.3.1 SVCs のスクリーニング分析結果

焼死体 61 体の血液中の CVSs、COHb 飽和度、シアン化物濃度、気道の煤の量を検査した結果を表 5 から表 7 に示す。焼死体は 4 つのカテゴリーに分類した：建物火災による焼死者（36 事例）、屋外での焼死体（2 事例）、灯油による焼身自殺者（17 事例）、ガソリンによる焼身自殺者（6 事例）。CVSs の検出量は“trace,” “detected,” “significantly detected” の 3 つの区分で半定量を行い、半定量基準は抽出イオンクロマトグラムのシグナル/ノイズ比で決定し、それぞれ ≥ 3 、 ≥ 5 、 ≥ 20 と定めた。

また、表 5 から表 7 中には記載しないが、陰性対照血液からは CVSs は検出されなかった。

表5. 焼死体血液のスクリーニング分析結果

compounds	retention time (min)	target ion (m/z)	COHb 60 % ≤ (carbon monoxide intoxication)														building fire																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
			COHb 60 % ≤ (carbon monoxide intoxication)														building fire																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
propionitrile	1.25	54						+++																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																</

+++* Compound with the largest peak area; +++ 'Significantly detected' (signal/noise ratio (S/N) ≥ 20 in the extract ion chromatogram); ++ 'Detected' (S/N ≥ 5); + 'Trace' (S/N ≥ 3). Amounts of soot: 1, Soot not observed in the macroscopic findings; 2, Soot reached only the pharynx or larynx; 3, Soot reached the trachea; 4, Soot reached the bilateral primary bronchi; 5, Soot reached deeper than the secondary bronchus (bronchioles).

表 6. 焼死体血液のスクリーニング分析結果

compounds	building fire																			outdoor fire	
	COHb 11-59 %																			37	38
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
propionitrile	+++	++		+	+				++	++	++	++							++		
isobutyronitrile	++			+	+					+	+	+							++		
butyronitrile																					
heptane																					
octane	++	+	+	+	+	+	+	+	++		++	+		++	++	+	+	+++	+		
nonane	++		+	+++	+	+	+	+	+	+	++	+		+++	+++	++	+	+++	++		
decane	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+++	+++	+	+++	+++	++		
undecane	+		+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+		+++	+++	+	+++	+++	+		
dodecane	+		+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+		+++	+++	+	+++	+++	++		
tridecane	+		+	+					+	++	++	++		++	++				+		
pyrrole	+++	++	++	++	+	++	++	+	+++	+++	++	++		++	++				+		
pyridine	++	+							+++	+++	+										
benzene	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	++	+		++	+++			+++	++	+++	
2,3-benzofuran	++	+++	+++	+++	++	+	++	+	++	+++	++	++						+++	++	+++	
toluene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++			+++	++	+++	
phenylacetylene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	++	+	+	++	++	++	
benzonitrile	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	
styrene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
ethylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
o-xylene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
m-xylene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
p-xylene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
indene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++		+				+			
2-ethynyltoluene																					
3-ethynyltoluene																					
4-ethynyltoluene																					
2-methylstyrene	++	++	+	+	+	+			++												
3-methylstyrene	++	++	+	+	+	+			++												
4-methylstyrene	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	++											
alpha-methylstyrene									++												
1,2,3-trimethylbenzene	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++		
1,2,4-trimethylbenzene	+	++	+	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++		
1,3,5-trimethylbenzene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-ethyl-2-methylbenzene				+						+											
1-ethyl-3-methylbenzene	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	+	+	+	+		
1-ethyl-4-methylbenzene	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
propylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
naphthalene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
1,2-dichlorobenzene									+												
1,3-dichlorobenzene																					
1,4-dichlorobenzene																					
amounts of soot	4	4	4	4	4	3	4	3	4	1	2	5	2	3	3	2	1	3	1	2	
cyanide concentrations (µg/m	5.86	5.20	0.47	1.09	1.24	0.20	0.23	0.60	0.18	3.45	0.73	0.12	0.07	0.38	0.86	0.54	0.23	1.72	0.34	0.42	
COHb levels (%)	39	39	39	36	34	26	18	16	14	11	11	10	8	7	5	5	4	2	8	2	

++++ Compound with the largest peak area; ++++ 'Significantly detected' (signal/noise ratio (S/N) ≥ 20 in the extract ion chromatogram); ++ 'Detected' (S/N ≥ 5); + 'Trace' (S/N ≥ 3). Amounts of soot: 1, Soot not observed in the macroscopic findings; 2, Soot reached only the pharynx or larynx; 3, Soot reached the trachea; 4, Soot reached the bilateral primary bronchi; 5, Soot reached deeper than the secondary bronchus (bronchioles).

表 7. 焼死体血液のスクリーニング分析結果

compounds	self-immolation with kerosene																			self-immolation with gasoline					
	COHb 11-59 %																			COHb 11-59 %					
	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61		
propionitrile																									
isobutyronitrile																									
butyronitrile																									
heptane		+		++	+		+	+++	+										+++	+			++		
octane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++*	++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++		
nonane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+	+++		
decane	+++*	+++	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*	+++	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+	+++		
undecane	+++*	+++	+++*	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	+++	+	+	+++		
dodecane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	+++	+	+	+++		
tridecane	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	+++	+	+	+++		
pyrrole				+		+++		+	++									+++	+++	+			++		
pyridine	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++		
benzene	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++		
2,3-benzofuran			+															+++	++	+++	+	+++	++		
toluene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*		
phenylacetylene	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	++		
benzonitrile		+			+	++	+	+	+									++	++	++	++	++	++		
styrene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
ethylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
o-xylene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
m-xylene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
p-xylene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
indene	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++		
2-ethynyltoluene																									
3-ethynyltoluene	+						+											+	++	++					
4-ethynyltoluene																			+	++					
2-methylstyrene		+	+	+	+	+	+	+	+									+	++	++	+	+	++		
3-methylstyrene																									
4-methylstyrene		+	+	+	+	+	+	+	+									+	++	++					
alpha-methylstyrene																									
1,2,3-trimethylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
1,2,4-trimethylbenzene	+++	+++*	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++*	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
1,3,5-trimethylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
1-ethyl-2-methylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
1-ethyl-3-methylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
1-ethyl-4-methylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
propylbenzene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
naphthalene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
1,2-dichlorobenzene																									
1,3-dichlorobenzene																									
1,4-dichlorobenzene																									
amounts of soot	5	5	4	3	2	4	2	3	3	2	3	4	3	4	3	2	1	1	5	5	3	2	3		
cyanide concentrations (µg/m	1.21	0.22	0.19	0.20	0.90	1.32	0.13	0.15	1.03	0.04	0.17	0.37	0.21	0.41	0.21	0.10	0.05	0.07	3.54	0.40	0.16	0.08	0.12		
COHb levels (%)	68	54	22	21	14	14	11	9	9	8	8	5	5	4	4	2	1	43	31	19	11	11	2		
site of the suicidal burns	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor	indoor		
+++* Compound with the largest peak area; +++ 'Significantly detected' (signal/noise ratio (S/N) ≥ 20 in the extract ion chromatogram); ++ 'Detected' (S/N ≥ 5); + 'Trace' (S/N ≥ 3). Amounts of soot: 1, Soot not observed in the macroscopic findings; 2, Soot reached only the pharynx or larynx; 3, Soot reached the trachea; 4, Soot reached the bilateral primary bronchi; 5, Soot reached deeper than the secondary bronchus (bronchioles).																									

3.3.2 建物火災による焼死の 36 事例

建物火災による焼死体 36 検体から合計 39 種類の CVSs が検出された。CVSs の中でもスチレンは 36 検体すべてから検出され、ピーク面積値が最大を示したケースが多かった。次いでフェニルアセチレンおよびエチルベンゼンは 35 検体から検出され、1 検体のみ検出されなかった。ナフタレンおよびベンゾニトリルは 34 検体から検出された。

建物火災による焼死体の血液から得られた典型的なクロマトグラム（表 5 中の No. 1）を図 10 の上段に示す。また、No. 1 の焼死体の周辺から採取した着衣等の燃焼残渣を同様に分析して得られたクロマトグラムを図 10 の下段に示す。No. 1 の血液からはベンゼン、トルエン、フェニルアセチレン、スチレン、エチルベンゼン、キシレン、インデン、ナフタレンを主体とした芳香族炭化水素が主に検出され、スチレンのピーク面積値が最も大きかった。燃焼残渣からも同様の CVSs が検出され、スチレンのピーク面積値が最も大きかった。この結果は、焼死者は火災時に生存しており、周辺の大気中に一定量分布した CVSs を呼吸により血液中に取り込んだことを示唆していると考えられた。

COHb は死後に生産される場合がある。Kojima らの報告¹⁰⁵によると、CO に暴露していない死体 7 体の心臓血から 0.3% から 6.0% の COHb が検出されている。また、生前の喫煙は COHb 飽和度の値を高める因子として働くことが知られており、非喫煙者の COHb の平均値は 0.81%、喫煙者は 5.33% であり有意な差が現れることが報告されている¹⁰⁶。これらの報告から 10% 以下の COHb は、火災時に発生した CO に焼死者が暴露されている証明となり得ない、つまり 10% 以下は解剖所見として有効ではないと考えられる。今回検証した 36 検体のうち、7 検体の COHb 飽和度が 10% 以下であった。しかし、その 7 検体すべてから複数の CVSs の検出に成功し、なおかつ、すべてにおいてスチレンが検出された。このことは、CVSs の検出が、COHb 飽和度が低い場合の火災時生存の強力な証拠となり得ることを示唆していると考えられる。

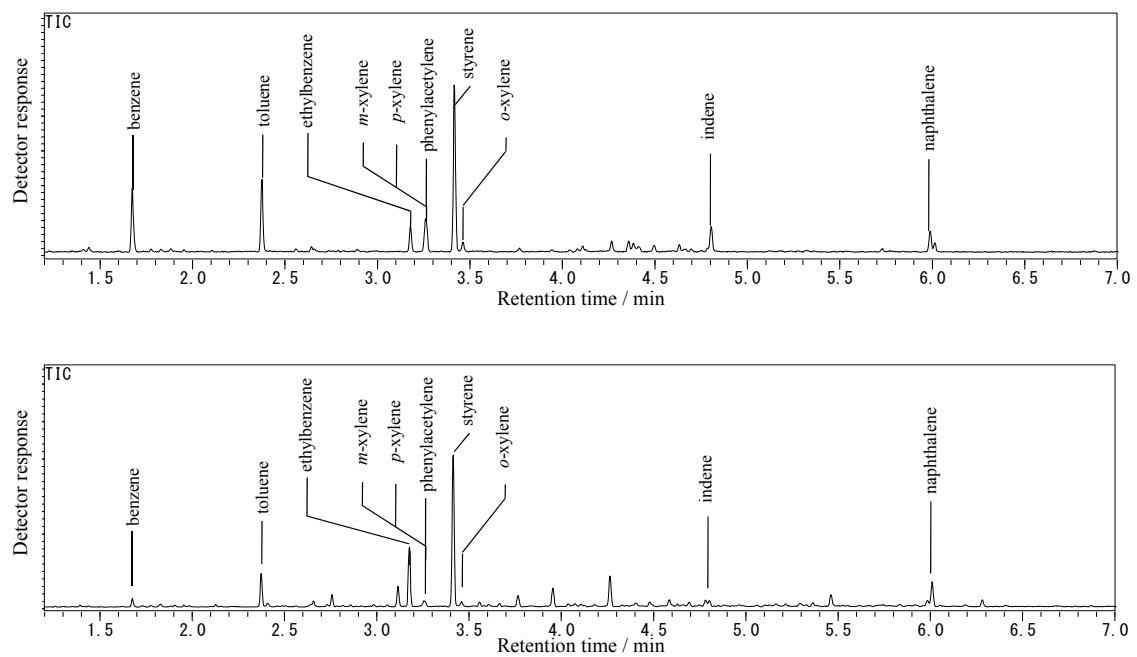


図 1 0. 焼死体 No. 1 の血液の分析結果（上）、および焼死体 No. 1 の着衣等の
 燃焼残渣の分析結果（下）。

3.3.3 灯油による焼身自殺の 17 事例

灯油を被って焼身自殺を図った 17 事例中 13 事例の検体では、直鎖脂肪族炭化水素（ノナン、デカン、ウンデカン、ドデカン）が最もピーク面積値が大きい傾向を示した。図 1 1 の上段には灯油で焼身自殺した焼死体から得られた典型的なクロマトグラムを示す（表 7 中の No. 43）。また図 1 1 の下段には灯油スタンダードのクロマトグラムを示す。両クロマトグラムは互いに非常に類似したパターンを示した。また、17 事例中 3 事例の検体では、1,2,4-トリメチルベンゼンのピーク面積値が最も大きくなる傾向を示した（図 1 2）。

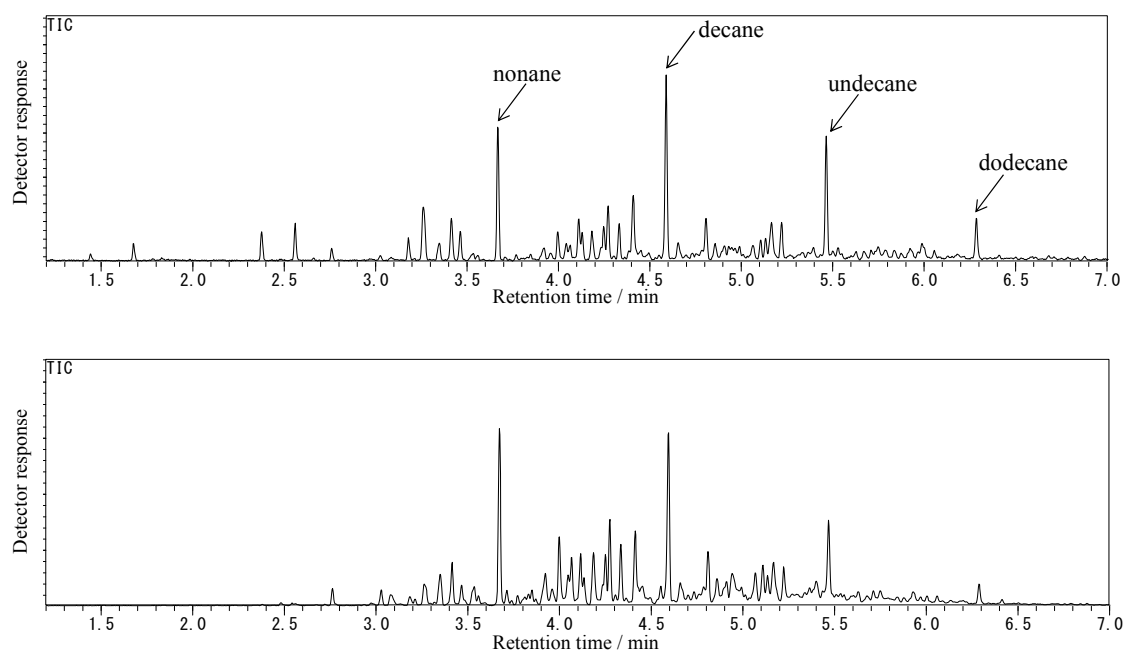


図 1 1. 灯油を使用して焼身自殺を図った者（焼死体 No. 43）の血液の分析結果（上）、および灯油スタンダードの分析結果（下）。

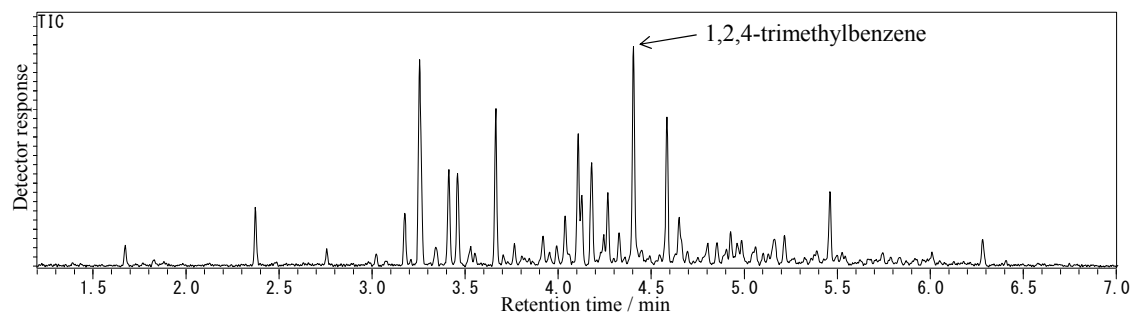


図 1 2. 灯油を使用して焼身自殺を図った者（焼死体 No. 40）の血液の分析結果。

3.3.4 ガソリンによる焼身自殺の 6 事例

ガソリンを被って焼身自殺を図った 6 事例すべての検体でトルエンのピーク面積値が最も大きくなる傾向を示した。図 1 3 の上段にはガソリンで焼身自殺した焼死体から得られた典型的なクロマトグラムを示す（表 7 中の No. 57）。また図 1 3 の下段にはガソリンスタンダードのクロマトグラムを示す。灯油の事例と同様に、ガソリンの焼身自殺の事例でも、両者のクロマトグラムは非常に類似したパターンを示した。

灯油やガソリンの焼身自殺事例の分析結果から、灯油やガソリンの成分が血液中に取り込まれていることは明確であり、生前に灯油やガソリンの蒸気を呼吸により血液中に取り込んだことが示唆された。

また、灯油やガソリンを使用した焼身自殺者の血液からもスチレンが検出されたが、灯油やガソリンにはもともとスチレンは含有されていない（図 1 4 および図 1 5）。したがって、スチレンは焼身自殺の際に着衣等が燃焼して発生し¹⁰⁷、ガソリンや灯油の蒸気とともに吸引したと考えられた。

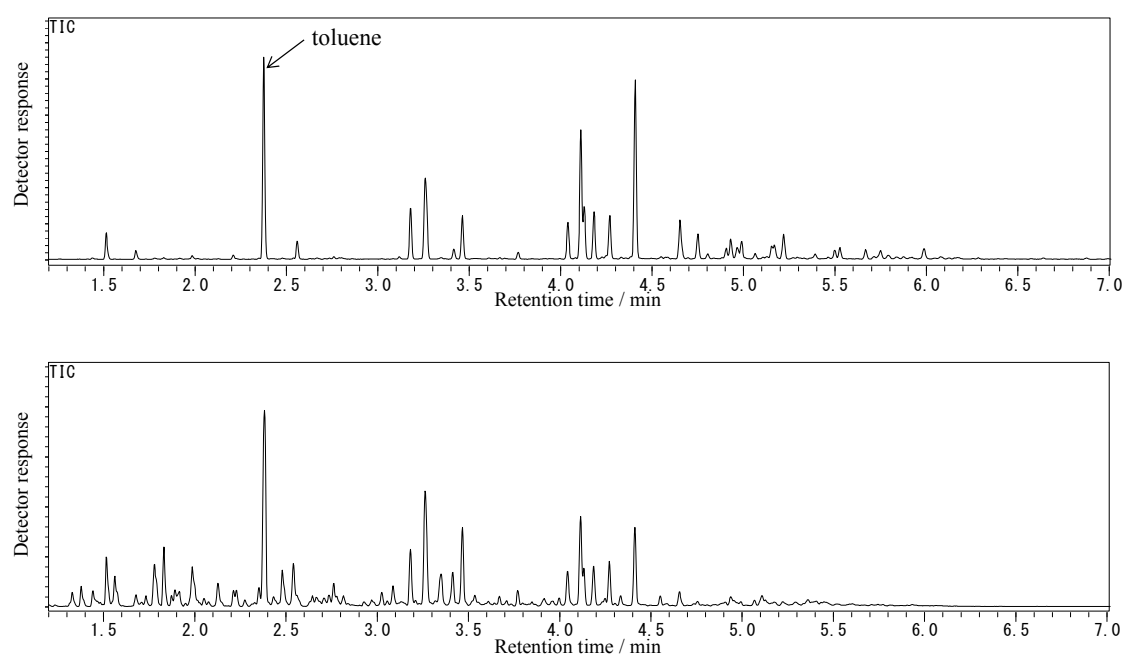


図 1 3. ガソリンを使用して焼身自殺を図った者（焼死体 No. 57）の血液の分析結果（上）、およびガソリン標準の分析結果（下）。

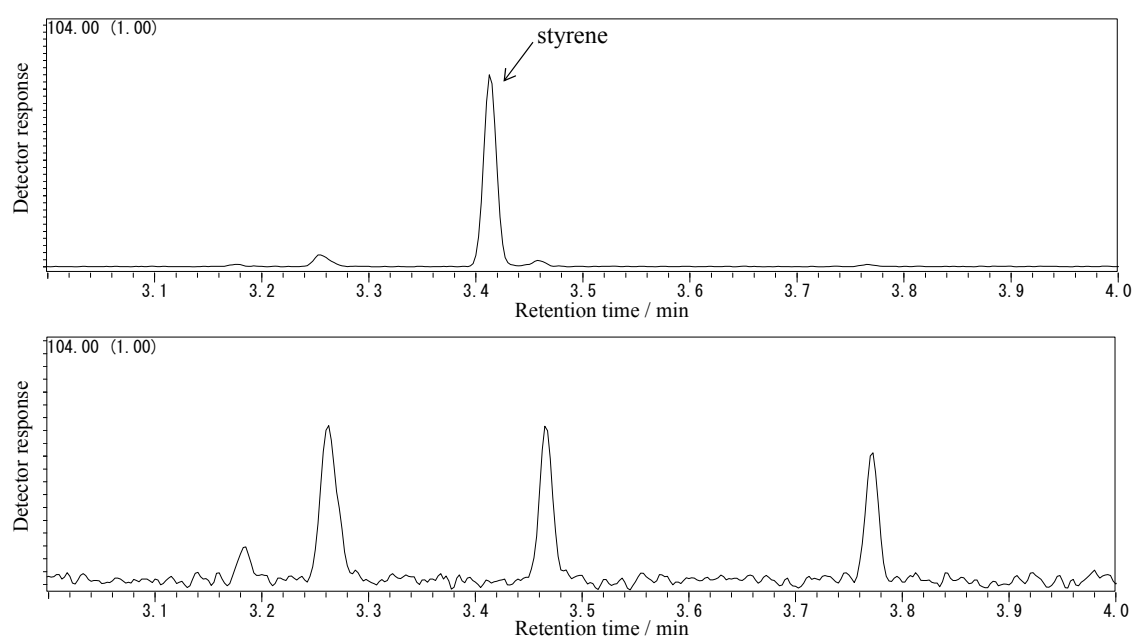


図 1 4. 灯油を使用した焼身自殺者 No. 43 の血液を分析した結果得られた m/z 104 における（スチレンのベースピーク）抽出イオンクロマトグラム、および灯油スタンダードの m/z 104 における抽出イオンクロマトグラム。

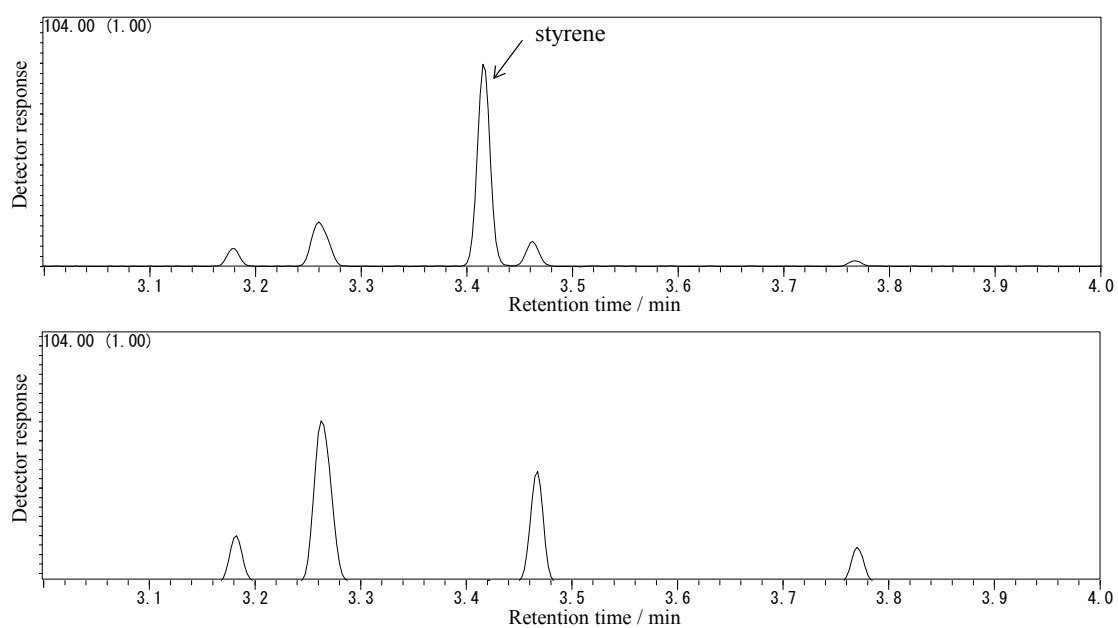


図 1 5. ガソリンを使用した焼身自殺者 No. 57 の血液を分析した結果得られた m/z 104 における (スチレンのベースピーク) 抽出イオンクロマトグラム、およびガソリンスタンダードの m/z 104 における抽出イオンクロマトグラム。

3.3.5 CVSs の検出数が少ない事例

いくつかの焼死体（表 6 および表 7 中の No. 33, 37, 38, 54, 55）からはあまり CVSs が検出されない、もしくはピーク面積値が極めて小さい場合があった。これらのうちの 2 検体は屋外における焼死で、具体的には No. 37 は自宅の火災中に外に這い出て庭で死亡したことが確認された。No. 38 は屋外で落ち葉を燃やしている最中に自身の着衣に火が燃え移り、そのまま焼死したことが確認された。したがって、現場の周辺に CVSs の発生源が限られていたことが原因であると考えられた。また、No. 33 および No. 54 は焼損が激しく、体表のほとんどに炭化が観察され、さらに血液が凝血塊もしくは軟凝血塊であった。そのため、CVSs を抽出する過程で、物理的に CVSs の揮発が抑制されたと考えられた。No. 55 は公園内で灯油を用いて自殺を図ったが、軽度の火傷で数分間生存してから死亡したことが確認されている。このことから使用した灯油の量は非常に少なかったことが推察され、そのために CVSs の検出量が少なかったと考えられた。

3.3.6 CVSs 検出頻度の算出

CVSs のうち特徴的な化合物の検出頻度を算出し、焼死の 4 種類の形態から得られる CVSs の種類および 4 種類間の関連性について調査した。表 8 は焼死の形態別にスチレン、C9-C12 直鎖脂肪族炭化水素（ノナン、デカン、ウンデカン、ドデカン）、トルエン、 α -メチルスチレン、C3 アルキルベンゼン（1,2,3-トリメチルベンゼン、1,2,4-トリメチルベンゼン、1,3,5-トリメチルベンゼン、1-エチル-2-メチルベンゼン、1-エチル-3-メチルベンゼン、1-エチル-4-メチルベンゼン、プロピルベンゼン）の検出頻度を表している。

スチレンは、灯油の焼身自殺事例 1 例を除いてすべての事例で検出された。しかし、スチレンが最大ピーク面積値として検出できた事例は建物火災の 30 例と屋外火災 1 例であった。この結果からスチレンが最大ピーク面積値で検出された場合は、建物火災焼死または屋外焼死のどちらかであると推定することができる。また、 α -メチルスチレンは建物火災の焼死体からのみ検出された。したがって、 α -メチルスチレンが検出された場合は、建物火災で焼死したことを示唆すると考えられる。 α -メチルスチレンが検出され、さらにスチレンが最大ピーク面積値で検出された場合は、建物火災で焼死したことを強く支持すると考えられる。

建物火災焼死および屋外焼死の半数以上で C9-C12 直鎖脂肪族炭化水素が 4 つ揃って検出されることはなかったが、灯油およびガソリンを用いた焼身自殺者の大多数で C9-C12 直鎖脂肪族炭化水素が 4 つ揃って検出された。特に灯油を用いた焼身自殺者からは C9-C12 直鎖脂肪族炭化水素のいずれかが最大ピーク面積値になるケースが 17 例中 13 例であった。したがって、C9-C12 直鎖脂肪族炭化水素がすべて検出され、そのうちのいずれかが最大ピーク面積値を示した場合、灯油による焼身自殺者である確率が高いと考えられる。

トルエンが検出された事例は多かったが、ガソリンを用いた焼身自殺者の事例ではすべてトルエンが最大ピーク面積値を示した。さらに、6 事例すべてにおいて C3 アルキルベンゼンが揃って検出された。この結果から、C3 アルキルベンゼンとともにトルエンが最大ピーク面積値で検出された場合、高い確率でガソリンによる焼身自殺者であると考えられる。

表 8．焼死体血液中における特定の化合物の検出頻度

type of fire-related death ($N = 61$)	styrene			<i>alpha</i> -methylstyrene			C9-C12 aliphatic hydrocarbons ^a			toluene			C3 alkylbenzenes ^b		
	F	$f_{N.D.}$	f_{max}	F	$f_{N.D.}$	f_{max}	F	$f_{N.D.}$	f_{max}	F	$f_{N.D.}$	f_{max}	F	$f_{N.D.}$	f_{max}
building fire ($n = 36$)	36	0	30	26	10	0	14	22	2	32	4	2	9	27	0
self-immolation with kerosene ($n = 17$)	16	1	0	0	17	0	16	1	13	12	5	0	14	3	3
self-immolation with gasoline ($n = 6$)	6	0	0	0	6	0	5	1	0	6	0	6	6	0	0
outdoor fire ($n = 2$)	2	0	1	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0

F , observed frequency

$f_{N.D.}$, frequency of non-detection

f_{max} , the number of samples which the given chemical showed the largest peak area

^a, F was counted when all four C9-C12 aliphatic hydrocarbons (nonane, decane, undecane, and dodecane) were present.

^b, F was counted when all seven C3 alkylbenzenes (1,2,3-trimethylbenzene, 1,2,4-trimethylbenzene, 1,3,5-trimethylbenzene, 1-ethyl-2-methylbenzene, 1-ethyl-3-methylbenzene, 1-ethyl-4-methylbenzene, and propylbenzene) were present.

3.3.7 血液中の CVSs と COHb、シアン化物、煤の量の関連性

血液中から“顕著に検出された”CVSs の数と COHb 飽和度、シアン化物濃度、および観察された煤の量の相関性を見積もった（図 1 6 A から F）。煤の量は肉眼所見により 5 段階に分類し、1：煤は観察されない、2：咽頭・喉頭部のみ煤がある、3：気管まで煤がある、4：左右主気管支まで煤がある、5：二次気管支（細気管支）より下まで煤がある、とした。建物火災焼死の場合、CVSs の検出数に対する COHb 飽和度、またはシアン化物濃度のピアソンの積率相関係数がそれぞれ 0.64、0.54 となり、中程度の相関を示した。また、煤の量との相関に関しては、5 と 3、4 と 3、4 と 2 の間で $p < 0.05$ となり、統計学上の有意差が確認された。一方で、灯油やガソリンを用いた焼身自殺の場合は、CVSs の検出数に対する COHb 飽和度、またはシアン化合物濃度のピアソンの積率相関係数がいずれも 0.39 となり、弱い相関を示した。また、煤の量とは、統計学上の有意差は確認されなかった。

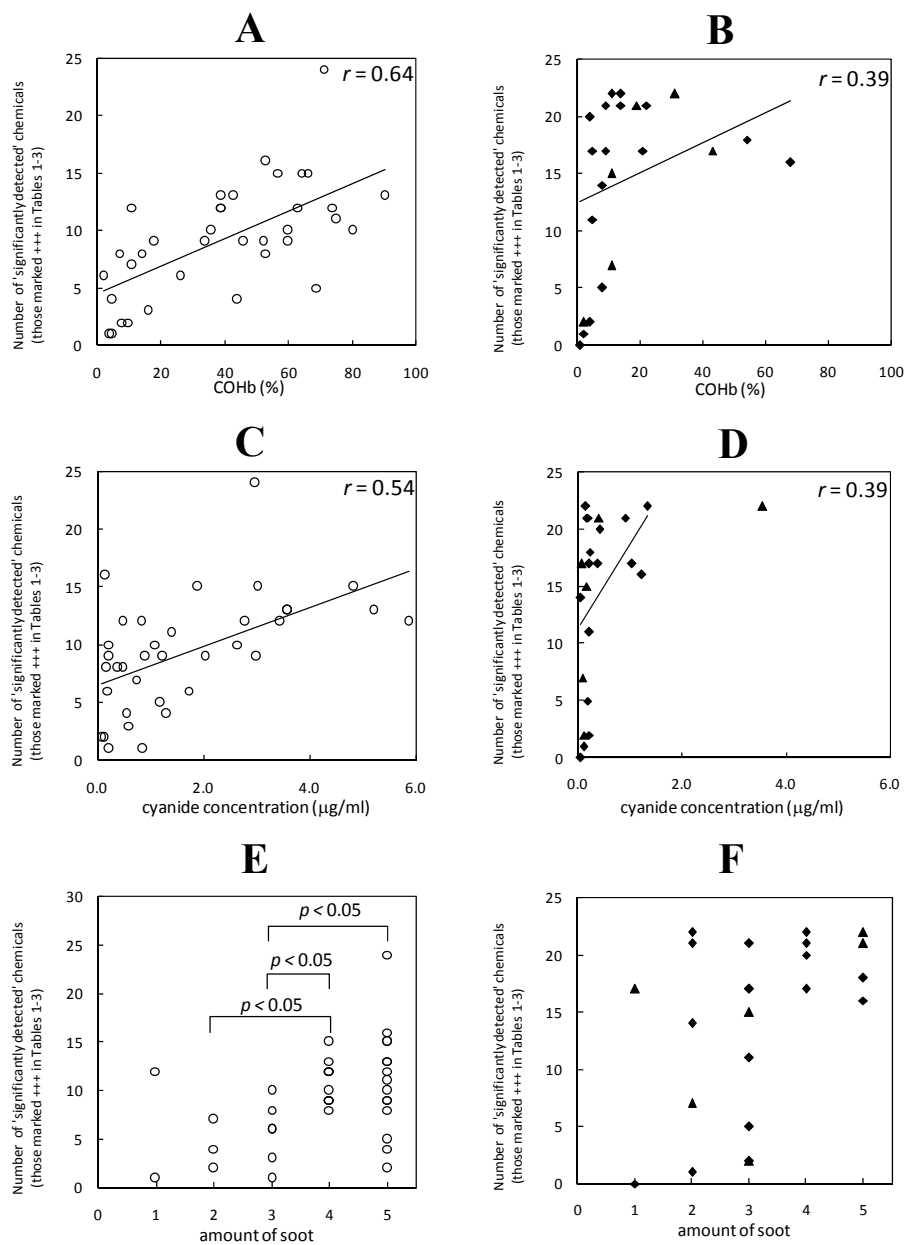


図 1 6. 焼死体の血液中から“顕著に検出された”CVSs の数（表 5 から表 7 内の +++ で示された CVSs）と COHb 飽和度（A: 建物火災 ○、B: 灯油 ◆ および ガソリン ▲ による焼身自殺）、シアン化物濃度（C: 建物火災、D: 焼身自殺）、煤の量（E: 建物火災、F: 焼身自殺）との相関関係。

3.4 考察

3.4.1 CVSs 検出頻度の考察

血液中から検出された CVSs が焼死体の種類とどのような関連性があるのかを調査した。得られた検出頻度を考慮すると、大量のスチレンとともに α -メチルスチレンが検出された場合、その焼死体は建物火災により焼死した可能性が非常に高い。大量の C9-C12 直鎖脂肪族炭化水素が検出された場合、その焼死体は灯油を用いて焼死（焼身自殺）した可能性が高い。大量のトルエンとともに C3 アルキルベンゼンが検出された場合は、その焼死体はガソリンを用いて焼死（焼身自殺）した可能性が高い。このように、焼死するまでの過程が異なると焼死体の血液から検出される成分に明確な差が生じることが明らかになった。これは、それぞれの CVSs の発生源の違いを反映しており、建物火災焼死では主に建築物や家具が燃焼した発生したガスを吸引しているのに対して、灯油またはガソリンによる焼死者は、建築物や家具が燃焼した発生したガスによりもむしろ灯油やガソリンの蒸気を主に吸引しているからであると考えられた。

3.4.2 CVSs の発生源

建物火災焼死の 36 事例すべてにおいてスチレンが検出された。スチレンは主に多種多様なプラスチック製品の熱分解により発生し、ポリスチレン^{108,109}、スチレン-メチルアクリレート共重合体¹¹⁰、ポリジビニルベンゼン¹¹¹のようなスチレン構造主体ビニル型ポリマー、ポリ塩化ビニル^{112,113}、ポリフッ化ビニル¹¹⁴、ポリ酢酸ビニル¹¹⁵のようなビニル型ポリマー、クロロプレンゴム¹¹⁶、スチレン-ブタジエンゴム¹¹⁷のようなジエン型エラストマーなどから熱分解により発生することが報告されている。ポリスチレンは住宅の断熱材として利用されており、ポリ塩化ビニルは壁紙や水道パイプとして利用されており、ほとんどの家庭においてこれらのプラスチック製品は存在する。したがって、その普及率の広さにより、すべての建物火災焼死の血液からスチレンが検出されたと考えられた。

α -メチルスチレンはポリスチレンやスチレン-メチルアクリレート共重合体のみから発生し、スチレンとは異なり発生する合成樹脂の種類が限られている。 α -メチルスチレンが発生したときは、スチレンも必ず発生している。しかしながら、 α -メチルスチレンの発生量はスチレンの 100 分の 1 以下である¹⁰⁸⁻¹¹⁰。それゆえ、 α -メチルスチレンは大量のポリスチレンやスチレン-メチルアクリレート共重合体が周辺環境中に存在している条件下でないと検出されないと考えられる。このような条件が揃うのは建物内のみなので、 α -メチルスチレンは建物火災の焼死体の血液からのみ検出されたと考えられた。

ベンズニトリルは主にアクリロニトリル-塩化ビニル共重合体¹¹⁸ およびアクリロニリル-ブタジエンゴム¹¹⁹から発生することが報告されている。これらの合成樹脂はあまり多くの日用品には使われていない。例えば、アクリル繊維、靴底、車の部品等に使われている。それゆえ、ベンズニトリルが検出された場合は、発生源をある程度絞り込むことが可能であり、アクリル繊維の着衣を着ているか、または靴を履いている可能性が高いと考えられる。

3.4.3 血液中の CVSs と COHb、シアン化物、煤の量の関連性

建物火災焼死の場合、“顕著に検出された”CVSs の数が 15 以下のときでさえ中程度から高濃度の COHb 飽和度およびシアン化物濃度を示した。それとは対照的に、ガソリンや灯油を用いた焼身自殺の場合、COHb 飽和度およびシアン化物濃度が低い値であるにもかかわらず“顕著に検出された”CVSs の数 15 以上となるケースが多く散見された。これは CVSs の発生源の違いに原因があると考えられる。建物火災焼死では、CVSs は建物や建築物の燃焼が唯一の発生源であり、CO やシアン化水素、煤も同様の発生源から燃焼により生成するため、比例関係を示すことは自然であると考えられる。一方、焼身自殺では、周辺環境が燃焼したことにより発生する CVSs より助燃剤の蒸気由来する CVSs の方が多いと考えられるために、CVSs の数と COHb 飽和度、シアン化物濃度、煤が比例関係を示しにくく、CVSs の検出数が多いにもかかわらず、COHb 飽和度、シアン化物濃度、煤の量が低い、または少なくなる傾向を示したと考えられた。

3.4.4 喫煙の影響

煙草の喫煙はベンゼンやトルエンなどの CVSs の発生因子であり、本研究において煙草の影響を無視することは不可能である。毎日喫煙している者の血液からベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、*o*-キシレン、*m/p*-キシレン、スチレン、1,4-ジクロロベンゼン、2,5-ジメチルフランが検出されることが報告されている¹²⁰。2,5-ジメチルフランを除いてこれらすべての化合物は焼死体の血液中からも検出されているため、これらの化合物の血中濃度を測定し、血液中 COHb 飽和度と同様にカットオフ値を設定する必要がある。焼死体の全サンプルにおいて、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、*o*-キシレン、*m/p*-キシレン、スチレン、1,4-ジクロロベンゼンの各濃度を定量した結果を表9に示す。また、カットオフ値は各化合物の喫煙者の血中濃度の最大値に定めた。ベンゼンおよびスチレンはカットオフ値以下になるケースは1例もなかった。それゆえ、この2つの化合物に関しては、喫煙の影響を無視できると考えられた。しかしながら、エチルベンゼン、*o*-キシレン、*m/p*-キシレン、1,4-ジクロロベンゼンは多くのケースでカットオフ値以下の濃度を示した。したがってこれらの化合物は、発生源が喫煙なのか焼死なのか区別が付かないため、焼死体の解剖所見に利用するには不適切であると考えられた。ガソリンを使用した焼身自殺の場合では、すべての事例でトルエン濃度がカットオフ値を上回ったが、灯油を使用した焼身自殺の場合ではいくつかのケースでカットオフ値を下回った。したがって、トルエンを解剖所見として利用するのであれば、喫煙の影響を排除するために定量が必要不可欠であると考えられた。トルエンはシンナー中毒者の血液中からも検出されることが知られており、その濃度は 6-110 $\mu\text{g/ml}$ であると報告されている¹²¹。この値は、本研究における焼死体血液中のトルエン濃度範囲とは有意な差があるため、シンナー中毒者と焼死体とは明確に区別が可能であると考えられる。

表 9．焼死者と喫煙者の血液中の揮発性有機化合物（VOC）濃度

compound	range of VOCs in daily smokers' blood ^a (ng/ml)	cutoff value ^b (ng/ml)	building fire (<i>n</i> = 36)			outdoor fire (<i>n</i> = 2)			kerosene (<i>n</i> = 17)			gasoline (<i>n</i> = 6)		
			conc. range (ng/ml)	<i>F</i>	<i>f</i>	conc. range (ng/ml)	<i>F</i>	<i>f</i>	conc. range (ng/ml)	<i>F</i>	<i>f</i>	conc. range (ng/ml)	<i>F</i>	<i>f</i>
benzene	0.025-1.10	1.10	2.0-1199.4	33	0	3.9-7.1	2	0	1.9-65.1	13	0	1.5-157.9	6	0
toluene	0.074-2.50	2.50	1.5-130.1	32	4	-	0	-	1.6-28.8	12	4	7.3-497.8	6	0
styrene	≤0.030-0.39	0.39	0.5-455.5	36	0	0.5-3.2	2	0	0.4-18.6	16	0	0.7-25.2	6	0
ethylbenzene	≤0.024-1.60	1.60	0.2-20.4	35	12	-	0	-	0.3-24.6	15	2	0.7-96.3	6	1
<i>o</i> -xylene	≤0.024-1.50	1.50	0.2-9.8	32	20	-	0	-	0.4-49.5	15	2	0.6-82.2	6	1
<i>m/p</i> -xylene	0.036-5.60	5.60	0.1-10.9	33	32	-	0	-	0.2-15.6	15	11	0.7-85.1	6	2
1,4-dichlorobenzene	≤0.120-16.0	16.0	1.0-85.0	21	16	-	0	-	1.0-12.1	10	10	1.2-4.1	4	4

F = observed frequency, *f* = number of samples lower than the cutoff values among *F*

^a reference [120]

^b cutoff value = the maximum concentration of each chemicals in daily smokers' blood

3.5 結論

本研究では、3 年間に亘り 61 検体の焼死体の血液を調査し、NeedlEx[®]を使うことによりほぼすべての血液から CVSs を検出することに成功した。本研究の分析方法を使うことにより、血液中から火災の燃焼に由来する化合物が 39 種類検出することが可能となった。COHb 飽和度が 10%以下、あるいはシアン化物濃度が 0.25 µg/ml 未満、または気道に煤が観察されない等、焼死における重要な解剖所見が失われている場合であっても CVSs は検出することが可能であった。しかしながら、これら 39 種類の CVSs のうち、エチルベンゼン、*o*-キシレン、*m/p*-キシレン、1,4-ジクロロベンゼンは喫煙者の血液からも同様の濃度範囲で検出されるため、これらの化合物に関しては焼死の解剖所見には利用できないと考えられた。それゆえ、それらを除いた 34 化合物が焼死の解剖所見として利用価値があるということが明らかになった。スチレンは灯油による焼身自殺の 1 例を除いてすべての事例で検出された。

焼死体の血液から検出された CVSs の種類は、建物火災による焼死、灯油を使用した焼身自殺による焼死、ガソリンを使用した焼身自殺による焼死の間で一般的に異なる傾向を示し、本分析方法により明確に区別できることが明らかになった。最大ピーク面積値を持つスチレンとともに α -メチルスチレンが検出されたときは建物火災による焼死、C9-C12 直鎖脂肪族炭化水素と C3 アルキルベンゼンがすべて揃って検出されたときは灯油を用いた焼身自殺による焼死、最大ピーク面積値を持つトルエンとともに C3 アルキルベンゼンが検出されたときはガソリンを用いた焼身自殺による焼死であると示唆された。したがって、血液中 CVSs の本分析方法は、従来の解剖所見からは判別が不可能であった焼死の種類を特定することを可能にした。しかしながら、61 検体のうち 5 検体は検出された CVSs が非常に少なかった。このうち 2 検体は屋外での焼死であり、周辺に CVSs の発生源となる素材が乏しかったためであると考えられた。他の 2 検体は焼損が激しい焼死体であり、血液が凝血塊、あるいは軟凝血塊となっていたために CVSs の揮発が抑制されたためであると考えられた。最後の 1 検体は屋外で灯油を用いた焼身自殺であったが、熱傷が軽度であり、しばらく生存していたため、使用した灯油量は極めて少ないと推定され、灯油や燃焼による CVSs

をあまり吸引しなかったと考えられた。

第4章 結言

本研究では、NeedlEx[®]という揮発性化合物の新しい抽出および濃縮デバイスを法医学における薬毒物の分析に活用し、実用性のある手法として確立することに成功した。

第2章では、NeedlEx[®]を誘導体化処理後のカルバメートの抽出に適用し、GC/MS で簡便に分析できる手法を開発した。この結果、課題とされていたカルバメートの熱分解性を抑制させた上で、尿や血清の夾雑物を抽出せずにカルバメートのみを選択的に抽出・濃縮することが可能となった。

第3章では、NeedlEx[®]を用いて、61 検体の焼死体の血液の CVSs を抽出・濃縮し、GC/MS により分析できる手法を開発した。CVSs は血液に溶解している量が極微量であったため、分析することが困難とされていたが NeedlEx[®]により分析が可能となった。これにより毒物学的な生前焼死の証明に関して、従来は COHb やシアン化物濃度のみであったが、新たに CVSs を利用した生前焼死の証明が可能となり、さらに従来では不可能であった焼死の過程や周辺環境まで推定することが可能となった。

本研究により、これまで課題があった種々の死因究明に対して、NeedlEx[®]を使った新しい分析手法を確立し、今後の法医鑑定の進歩に貢献することができると考えられた。また近年、危険ドラッグ流行による中毒事例や、青酸、VX ガス等による毒殺事件が起こっており、今後も多種多様な中毒が発生すると予想される。本研究で用いた NeedlEx 濃縮法は、充填剤との相性次第であらゆる揮発性化合物に適用可能であると考えられる。今回の研究で成功したように、NeedlEx 濃縮法が、様々な場面で今後流行し得る中毒起因物質の分析に必ずや役立つと期待する。

引用文献

- 1) S. Suzuki, Y. Suzuki, Arsenic compounds and inorganic poisons. In: O. Suzuki, M. Yashiki (Eds.), Handbook of practical analysis of drugs and poisons in human specimens: chromatographic method, Jiho Inc., Tokyo, 2002, pp. 557-566.
- 2) M. Kageura, General statement. In: Forensic Toxicology working group (Eds.), Manual for Forensic Toxicology Analysis of the Japanese Society of Legal Medicine, Japanese Society of Legal Medicine, Tokyo, 1999, pp. 1-7.
- 3) National Research Institute of Police Science (Eds.), Annual case reports of drugs and toxic poisoning in Japan, National Police Agency, Tokyo, 1984-2014.
- 4) 石澤不二雄、乗峯絵里、本田克也, インターネットに影響されるガス中毒, 中毒研究, 24 (2011) 3-8.
- 5) 清田和也, インターネットと中毒の関わり, 中毒研究, 22 (2009) 309-314.
- 6) 坂東宏樹、杉本達哉、山田妃沙子、三井浩、織田裕行、平川明彦、村尾佳則、中谷壽男、木下利彦, 過量服薬患者の心理的・社会的背景と予防策, 中毒研究, 24 (2011) 9-15.
- 7) Y. Fujita, K. Terui, M. Fujita, A. Kakizaki, N. Sato, K. Oikawa, H. Aoki, K. Takahashi, S. Endo. Five cases of aconite poisoning: Toxicokinetics of aconitines, J. Anal. Toxicol., 31 (2007) 132-137.
- 8) N. Yoshioka, K. Gonmori, A. Tagashira, O. Boonhooi, M. Hayashi, Y. Saito, M. Mizukaki. A case of aconitine poisoning with analysis of aconitine alkaloids by GC/SIM, Forensic Sci. Int., 81 (1996) 117-123.

- 9) H. Niinuma, H. Aoki, T. Suzuki, M. Shibata, Y. Moriai, T. Suzuki, S. Ohuchi, K. Kawazoe, K. Hiramori. Two survival cases of severe aconite poisoning by percutaneous cardiopulmonary support system and cardiopulmonary bypass for fatal arrhythmia: A case report, *Int. J. Emer. Intensive Med.*, 6 (2003) 47.
- 10) S. P. Elliott, A case of fatal poisoning with the aconite plant: quantitative analysis in biological fluid, *Sci. Justice*, 42 (2002) 111-115.
- 11) K. Kazuma, M. Satake, K. Konno, A case of fatal aconite poisoning, and its background, *Food Hyg. Saf. Sci.*, 54 (2013) 419-425.
- 12) R. Pullela, L. Young, B. Gallagher, S.P. Avis, E.W. Randell, A case of fatal aconitine poisoning by monkshood ingestion, *J. Forensic Sci.*, 53 (2008) 491-494.
- 13) Y. Gaillard, G. Pepin, LC-EI-MS determination of veratridine and cevadine in two fatal cases of veratrum album poisoning, *J. Anal. Toxicol.*, 25 (2001) 481-485.
- 14) T. Grobosch, T. Binscheck, F. Martens, D. Lampe, Accidental intoxication with veratrum album, *J. Anal. Toxicol.*, 32 (2008) 768-773.
- 15) T.Y.K. Chan, Ciguatera fish poisoning in east asia and southeast asia, *Mar. Drugs*, 13 (2015) 3466-3478.
- 16) N. Oshiro, T. Matsuo, S. Sakugawa, K. Yogi, S. Matsuda, T. Yasumoto, Y. Inafuku, Ciguatera fish poisoning on Kakeroma Island, *Trop. Med. Health*, 39 (2011) 53-57.
- 17) C.K. Wong, P. Hung, K.L.H. Lee, T. Mok, T. Chung, K.M. Kam, Features of Ciguatera fish poisoning cases in Hong Kong 2004-2007, *Biomed. Environ. Sci.*, 21 (2008) 521-527.

- 18) S.P. Nordt, J. Wu, S. Zahller, R.F. Clark, F.L. Cantrell, Palytoxin poisoning after dermal contact with zoanthid coral, *J. Emer. med.*, 40 (2011) 397-399.
- 19) K. Hoffmann, M.H. Clausen, C. Buhl, M.W. Buchler, P. Schemmer, D. Mebs, S. Kauferstein, A case of Palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury, *Toxicon*, 51 (2008) 1535-1537.
- 20) T. Shinzato, A. Furusu, T. Nishino, K. Abe, T. Kanda, T. Maeda, S. Kohno, Cowfish (*Umisuzume*, *lactoria diaphana*) poisoning with phabdomyolysis, *Internal Med.*, 47 (2008) 853-856.
- 21) F.R. Chowdhury, H.A.M.N. Ahasan, A.K.M.M. Rashid, A.A. Mamun, S.M. Khaliduzzaman, Tetrodotoxin poisoning: a clinical analysis, role of neostigmine and short-term outcome of 53 cases, *Singapore Med. J.*, 48 (2007) 830-833.
- 22) J. Kanchanapongkul, Tetrodotoxin poisoning following ingestion of the toxic eggs of the horseshoe crab *carinoscorpius rotundicauda*, A case series from 1994 through 2006, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 39 (2008) 303-306.
- 23) D.F. Hwang, T. Noguchi, Tetrodotoxin poisoning, *Adv. Food Nutr. Res.*, 52 (2007) 141-236.
- 24) C.C. Yang, S.C. Liao, J.F. Deng, Tetrodotoxin poisoning in Taiwan: an analysis of poison center data, *Vet. Hum. Toxicol.*, 38 (1996) 282-286.
- 25) A.U. Raysoni, T.H. Stock, J.A. Sarnat, M.C. Chavez, S.E. Sarnat, T. Montoya, F. Holguin, W.W. Li, Evaluation of VOC concentrations in indoor and outdoor microenvironments at near-road schools, *Environ. Pollut.*, 231 (2017) 681-693.
- 26) A. Antonucci, M. Vitali, P. Avino, M. Manigrasso, C. Protano, Sensitive

multiresidue method by HS-SPME/GC-MS for 10 volatile organic compounds in urine matrix: a new tool for biomonitoring studies on children, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408 (2016) 5789-5800.

27) T. Kojima, M. Yashiki, M. Ohtani, F. Chikasue, T. Miyazaki, Determination of dimethoate in blood and hemoperfusion cartridge following ingestion of formothion: a case study, *Forensic Sci. Int.* 48 (1990) 79-88.

28) T. Kojima, M. Yashiki, T. Miyazaki, F. Chikasue, M. Ohtani, Detection of S-methylfenitrothion, aminofenitrothion, aminofenitroxon, and acethylaminofenitroxon in the urine of a fenitrothion intoxication case, *Forensic Sci. Int.*, 41 (1989) 245-253.

29) I. Shu, A. Alexander, M. Jones, J. Jones, A. Negrusz, Determination of methamphetamine enantiomer composition in human hair by non-chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry method, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1028 (2016) 145-152.

30) S. Maas, K. Sydow, B. Madea, C. Hess, Separation of ortho, meta and para isomers of methylmethcathinone (MMC) and methylethcathinone (MEC) using LC-ESI-MS/MS: application to forensic serum samples, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1051 (2017) 118-125.

31) E.I. Miller, F.M. Wylie, J.S. Oliver, Simultaneous detection and quantification of amphetamines, diazepam and its metabolites, cocaine and its metabolites, and opiates in hair by LC-ESI-MA-MA using a single extraction method, *J. Anal. Toxicol.*, 32 (2008) 457-469.

32) X. Zhou, C. Chen, F. Zhang, Y. Zhang, Y. Feng, H. Ouyang, Y. Xu, H. Jiang, Metabolism and bioactivation of the tricyclic antidepressant amitriptyline in human liver microsomes and human urine, *Bioanalysis*, 8 (2016) 1365-1381.

- 33) H. Ziarrusta, L. Mijangos, A. Prieto, N. Etxebarria, O. Zuloaga, M. Olivares, Determination of tricyclic antidepressants in biota tissue and environmental waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408 (2016) 1205-1216.
- 34) H. Niitsu, Y. Fujita, S. Fujita, R. Kumagai, M. Takamiya, Y. Aoki, K. Dewa, Distribution of aconitum alkaloids in autopsy cases of aconite poisoning, *Forensic Sci. Int.* 227 (2013) 111-117.
- 35) N. Guo, M. Liu, D. Yang, Y. Huang, X. Niu, R. Wu, Y. Liu, G. Ma, D. Dou, Quantitative LC-MS/MS analysis of seven ginsenosides and three aconitum alkaloids in Shen-Fu decoction, *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 165.
- 36) A. Lin, X. Su, D. She, K. Qiu, Q. He, Y. Liu, LC-MS/MS determination and comparative pharmacokinetics of strychnine, brucine and their metabolites in rat plasma after intragastric administration of each monomer and the total alkaloids from Semen Strychni, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1008 (2016) 65-73.
- 37) K. Aoki, H. Isono, Y. Kuroiwa, H. Kozuka, A. Hamada, General statement, In: *Pharmaceutical Society of Japan (Eds.), Standard method of chemical analysis in poisoning with commentary*, fourth edition, Nanzando, Tokyo, 1992, pp. 1-56.
- 38) K.D. Watson, P. Wexler, Chapter 2 History of Toxicology. In: P. Wexler, S. G. Gilbert, P. J. Hakkinen, A. Mohapatra (Eds.), *Information Resources in Toxicology*, Fourth ed., Elsevier, Amsterdam, 2009, pp. 11-29.
- 39) A. Burgin, Some practical modifications to the Stas-Otto method of analysis, *J. Pharm. Berg.*, 7 (1952) 3-9.

- 40) R. A. Kalekin, D. S. Lazarian, M. G. Tsybulina, The analysis of tiapride in cadaveric material, *Sud. Med. Ekspert*, 50 (2007) 24-27.
- 41) E. N. Stepanova, V. V. Bazhanov, An analysis of eglonyl in cadaveric material, *Sus. Med. Ekspert*, 40 (1997) 28-30.
- 42) W. C. Bress, J. H. Bidanset, L. Lukash, Analysis of post mortem brain tissue using EMIT, *J. Anal. Toxicol.*, 6 (1982) 264-265.
- 43) K. Aoki, Y. Kuroiwa, Y. Suzuki, K. Terada, T. Yoshida, I General statement, In: *Pharmaceutical Society of Japan (Eds.), Standard method of chemical analysis in poisoning with commentary 2006*, Tokyokagakudojin, Tokyo, 2006, pp. 4-33.
- 44) K. Usui, M. Hashiyada, Y. Hayashizaki, Y. Igari, T. Hosoya, J. Sakai, M. Funayama, Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis, *Forensic Toxicol.*, 32 (2014) 139-147.
- 45) K. Usui, Y. Hayashizaki, M. Hashiyada, M. Funayama, Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method, *Legal Med.*, 14 (2012) 286-296.
- 46) K. Kudo, Y. Usumoto. K. Usui, M. Hayashida, E. Kurisaki, K. Saka, A. Tsuji, N. Ikeda, Rapid and simultaneous extraction of acidic and basic drugs from human whole blood for reliable semi-quantitative NAGINATA drug screening by GC-MS, *Forensic Toxicol.*, 32 (2014) 97-104.
- 47) J. Rositano, P. Harpas, C. Kostakis, T. Scott, Supported liquid extraction (SLE) for the analysis of methylamphetamine, mthylenedioxymethylamphetamine and delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid and blood of drivers, *Forensic Sci. Int.*, 265 (2016) 125-130.

48) P. Sramska, A. Maciejka, A. Topolewska, P. Stepnowski, L. P. Halinski, Isolation of atropine and scopolamine from plant material using liquid-liquid extraction and EXtrelut[®] columns, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1043 (2017) 202-208.

49) T. Yamamuro, H. Ohta, M. Aoyama, D. Watanabe, Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in human serum and urine using diatomaceous earth-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 969 (2014) 85-94.

50) GL Science Inc. (Eds.), *Solid Phase Extraction (SPE) guide book*, GL Science Inc., Tokyo, 2012, pp. 14.

51) A. Namera, A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, M. Yahata, M. Yashiki, M. Nagao, Extraction of amphetamines and methylenedioxyamphetamines from urine using a monolithic silica disk-packed spin column and high-performance liquid chromatography-diode array detection, *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 71-75.

52) A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, K. Murakami, M. Nagao, A. Namera, Monolithic silica spin column extraction and simultaneous derivatization of amphetamines and 3,4-methylenedioxyamphetamines in human urine for gas chromatographic-mass spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta.*, 661 (2010) 42-46.

53) T. Saito, S. Morita, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, M. Nagao, S. Inokuchi, Simultaneous determination of dibucaine and naphazoline in human serum by monolithic silica spin column extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life*

Sci., 872 (2008) 186-190.

54) X.P. Lee, T. Kumazawa, M. Fujishiro, C. Hasegawa, T. Arinobu, H. Seno, A. Ishii, K. Sato, Determination of paraquat and diquat in human body fluids by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 39 (2004) 1147-1152.

55) C. Fuke, T. Arao, Y. Morinaga, H. Takaesu, K. Ameno, T. Miyazaki, Analysis of paraquat, diquat and two diquat metabolites in biological materials by high-performance liquid chromatography, *Legal Med. (Tokyo)*, 4 (2002) 156-163.

56) H. Miyaguchi, K. Kuwayama, K. Tsujikawa, T. Kanamori, Y. T. Iwata, H. Inoue, T. Kishi, A method for screening for various sedative-hypnotics in serum by liquid chromatography / single quadrupole mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.*, 157 (2006) 57-70.

57) N. Karlonas, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, Development of an SPE method for the determination of zaleplon and zopiclone in hemolyzed blood using fast GC with negative-ion chemical ionization MS, *J. Sep. Sci.*, 37 (2014) 551-557.

58) R. Bade, L. Bijlsma, J. V. Sancho, J. A. Baz-Lomba, S. Castiglioni, E. Castrignano, A. Causanilles, E. Gracia-Lor, B. Kasprzyk-Hordern, J. Kinyua, A. K. McCall, A. L. van Nuijs, C. Ort, B. G. Plosz, P. Ramin, N. I. Rousis, Y. Ryu, K. V. Thomas, P. de Voogt, E. Zuccato, F. Hernandez, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of synthetic cathinones and phenethylamines in influent wastewater of eight European cities, *Chemosphere*, 168 (2017) 1032-1041.

59) Z. Yu, Z. Wu, F. Gong, R. Wong, C. Liang, Y. Zhang, Y. Yu, Simultaneous determination of six toxic alkaloids in human plasma and urine using capillary zone electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, 35 (2012)

2773-2780.

60) H. Muramaya, H. Mukai, N. Moriyama, Comparison between passive sampling and pressurized sampling into canisters for measuring volatile organic compounds in air, *J. Environ. chem.*, 10 (2000) 27-34.

61) D.A. Brymer, L.D. Ogle, C.J. Jones, D.L. Lewis, Viability of using SUMMA polished canisters for the collection and storage of parts per billion by volume level volatile organics, *Environ. Sci. Technol.*, 30 (1996) 188-195.

62) T.J. Kelly, P.J. Callahan, J.D. Pleil, G.F. Evans, Method development and field measurements for polar volatile organic compounds in ambient air, *Environ. Sci. Technol.*, 27 (1993) 1146-1153.

63) T.J.Kelly, M.W. Holdren, Applicability of canisters for sample storage in the determination of hazardous air pollutants, *Atmospheric Environment*, 29 (1995) 2595-2608.

64) H. Karasawa, M. Kimura, C. Wakuda, M.K. Kurihara, K. Tsujino, Y. Tani, S. Hashimoto, Simultaneous determination of volatile halogenated organic compounds in brackish water and seawater by purge and trap-gas chromatography / mass spectrometry, *Bunseki Kagaku*, 59 (2010) 1149-1154.

65) A.S. Sonmezdag, H. Kelebek, S. Selli, Characterization of aroma-active and phenolic profiles of wild thyme (*Thymus serpyllum*) by GC-MS-Olfactometry and LC-ESI-MS / MS, *J. Food Sci. Technol.*, 53 (2016) 1957-1965.

66) M. Sun, C. Lopez-Velandia, D.R. Knappe, Cape fear river watershed by heated purge-and-trap preconcentration and gas chromatography-mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.*, 50 (2016) 2246-2254.

- 67) A. Fredes, C. Sales, M. Barreda, M. Valcarcel, S. Rosello, J. Beltran, Quantification of prominent volatile compounds responsible for muskmelon and watermelon aroma by purge and trap extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry determination, *Food Chem.*, 190 (2016) 689-700.
- 68) K. Van Den Houwe, C. Evrard, J. Van Loco, F. Lynen, E. Van Hoeck, Use of Tenax® films to demonstrate the migration of chemical contaminants from cardboard into dry food, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 34 (2017) 1261-1269.
- 69) S.A. Nutile, A.D. Harwood, F.L. Sinche, K.E. Huff Hartz, P.F. Landrum, M.J. Lydy, Methodological and environmental impacts on bioaccessibility estimates provided by single-point Tenax extractions, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 72 (2017) 612-621.
- 70) P.C. Van Noort, A. Poot, A.A. Koelmans, Analysis of organic contaminant desorption kinetic data for sediments and soils: implications for the Tenax extraction time for the determination of bioavailable concentrations, *Sci. Total Environ.*, 490 (2014) 235-238.
- 71) M.J. Lydy A.D. Harwood, S.A. Nutile, P.F. Landrum, Tenax extraction of sediments to estimate desorption and bioavailability of hydrophobic contaminants: a literature review, *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 11 (2015) 208-220.
- 72) K. Petel, C. Ruiz, R. Calderon, M. Marcelo, R. Rojas, Characterisation of volatile profiles in 50 native Peruvian chili pepper using solid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry (SPME-GCMS), *Food Res. Int.*, 89 (2016) 471-475.
- 73) H.H. Jelen, A. Gracka, Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with

hydrodistillation, J. Chromatogr. A, 1418 (2015) 200-209.

74) S. Popiel, M. Sankowska, Determination of chemical warfare agents and related compounds in environmental samples by solid-phase microextraction with gas chromatography, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 8457-8479.

75) M.F. Alpendurada, Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis, J. Chromatogr. A, 889 (2000) 3-14.

76) X. Lee, L. Zhang, D. Huang, N. An, F. Yang, W. Jiang, B. Fang, Analysis of the stable carbon isotope composition of formic and acetic acids, Anal Biochem., 436 (2013) 178-186.

77) X. Lee, D. Huang, D. Lou, J. Pawliszyn, Needle trap extraction for GC analysis of formic and acetic acids in aqueous solution, J. Sep. Sci., 35 (2012) 1675-1981.

78) I. Ueta, Y. Saito, Needle-type sample preparation devices for gas-chromatographic analysis, Bunseki Kagaku, 60 (2011) 833-844.

79) F. Ishizawa, T. Ishiwata, K. Miyata, T. Yoshida, Application of extraction needle using selective and enhanced polymer to the analysis of the sample containing poisonous material, Jpn. J. Toxicol. 18 (2005) 69-76.

80) T. Ishiwata, F. Ishizawa, Application of a NeedleExTM to the analysis of light mineral oils, Jpn. J. Forensic Sci. Tech., 10 (2005) 135-140.

81) T. Ishiwata, F. Ishizawa, Application of a NeedleExTM to chemical weapons, Jpn. J. Toxicol., 19 (2006) 61-62.

82) E. Norimine, T. Ishiwata, F. Ishizawa, Application of a NeedleExTM to the extract

analysis of tear gas and chloropicrin, *Jpn. J. Forensic Sci. Tech.* 13 (2008) 195–199.

83) E. Norimine, T. Ishiwata, T. Yoshida, K. Miyata, F. Ishizawa, Y. Sugano, K. Honda, Application of a NeedleExTM to stench matters for detecting the cause of stench, *Jpn. J. Clin. Toxicol.* 24 (2011) 22–23.

84) S.J. Strating, T.J. Juarez, M. E. Stevens, D. W. White, P.A. Smith, Short duration needle trap sampling with gas chromatography analysis to determine nearly instantaneous concentrations of selected organic vapor contaminants, *J. Occup. Environ. Hyg.* 10 (2013) 674–684.

85) K. Jobu, C. Sun, S. Yoshioka, J. Yokota, M. Onogawa, C. Kawada, K. Inoue, T. Shuin, T. Sendo, M. Miyamura, Metabolomics study on the biochemical profiles of odor elements in urine of human with bladder cancer, *Biol. Pharm. Bull.* 35 (2012) 639–642.

86) M.J. Tsai, S.N. Wu, H.A. Cheng, S.H. Wang, H. T. Chiang, An outbreak of food-borne illness due to methomyl contamination, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 41 (2003) 969-973.

87) J. Pfordt, H. Magerl, R. Vock, Tödliche vergiftungen mit Propoxur[®], *Z. Rechtsmed.*, 98 (1987) 43-48.

88) T. Miyazaki, M. Yashiki, T. Kojima, F. Chikasue, A. Ochiai, Y. Hidani, Fatal and non-fatal methomyl intoxication in an attempted double suicide, *Forensic Sci. Int.* 42 (1989) 263-270.

89) P. Picotte, P. Perreault, Suicide with carbofuran. *Bull. Int. Assoc. Forensic Toxicol.* 21 (1991) 38-40.

90) S.K. Lee, K. Ameno, S.W. In, W.K. Yang, K.S. Koo, Y.C. Yoo, T. Kubota, S. Ameno,

I. Ijiri, Acute fatal poisoning cases due to furathiocarb ingestion, *Forensic Sci. Int.*, 101 (1999) 65-70.

91) O. Suzuki, H. Hattori, J. Liu, H. Seno, T. Kumazawa, Positive- and negative-ion mass spectrometry and rapid clean-up of some carbamate pesticides, *Forensic Sci. Int.*, 46 (1990) 169-180.

92) K. Hoshino, R. Kato, N. Sato, K. Sakai, Gas chromatography of carbamate insecticides with alkali hydrolysates, *Food Hyg. Saf. Sci.*, 16 (1975) 275-281.

93) J.W. Westley, B. Halpern, Use of (-)-menthyl chloroformate in the optical analysis of asymmetric amino and hydroxyl compounds by gas chromatography, *J. Org. Chem.*, 33 (1968) 3978-3980.

94) M.W. Skidmore, Derivatization for chromatographic resolution of optically active compounds, In: K. Blau, J. Halket (Eds.), *Handbook of derivatives for chromatography*, second ed., John Wiley & Sons, Ltd., 1993, pp. 205-237.

95) A.K. Chaturvedi, D.R. Smith, D.V. Canfield, Blood carbon monoxide and hydrogen cyanide concentrations in the fatalities of fire and non-fire associated civil aviation accidents, 1991-1998., *Forensic Sci. Int.* 121 (2001) 183–188.

96) K. Matsubara, A. Akane, S. Takahashi, H. Shiono, Y. Fukui, Gas chromatographic determination for forensic purposes of petroleum fuel inhaled just before fatal burning, *J. Chromatogr. B*, 424 (1988) 49–59.

97) K. Matsubara, A. Akane, C. Maseda, H. Shiono, First pass phenomenon of inhaled gas in the fire victims, *Forensic Sci. Int.* 46 (1990) 203–208.

98) L.A. Ferrari, M.G. Arado, L. Giannuzzi, G. Mastrantonio, M.A. Guatelli, Hydrogen

cyanide and carbon monoxide in blood of convicted dead in a polyurethane combustion: a proposition for the data analysis, *Forensic Sci. Int.* 121 (2001) 140–143.

99) M.M. O'Mara, High-temperature pyrolysis of poly(vinyl chloride): Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the pyrolysis products from PVC resin and plastisols, *J. Polymer Sci. A*, 8 (1970) 1887–1899.

100) E.I. Eger 2nd, C.P. Larson Jr., Anaesthetic solubility in blood and tissues: values and significant, *Brit. J. Anaesth.* 36 (1964) 140–149.

101) M. Morinaga, S. Kashimura, K. Hara, Y. Hieda, M. Kageura, The utility of volatile hydrocarbon analysis in cases of carbon monoxide poisoning, *Int. J. Legal Med.* 109 (1996) 75–79.

102) K. Yonemitsu, A. Sasao, T. Oshima, S. Mimasaka, Y. Ohtsu, Y. Nishitani, Quantitative evaluation of volatile hydrocarbons in post-mortem blood in forensic autopsy cases of fire-related deaths, *Forensic Sci. Int.* 217 (2012) 71–75.

103) F. Ishizawa, A study on the spectrophotometric determination of carboxyhemoglobin in blood “Isosbestic Point” method, *Jpn. J. Legal Med.* 35 (1981) 191–200.

104) R. W. Darr, T. L. Capson, F. D. Hileman, Determination of hydrogen cyanide in blood using gas chromatography with alkali thermionic detection, *Anal. Chem.* 52 (1980) 1379–1381.

105) T. Kojima, Y. Nishiyama, M. Yashiki, I. Une, Postmortem formation of carbon monoxide, *Forensic Sci. Int.* 19 (1982) 243–248.

106) A. Buha, A. Vaseashta, Z. Bulat, V. Matvic, Carboxyhemoglobin in blood of

smokers and non-smokers determined by gas chromatography with thermal conductivity detector, NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics, Advanced Sensors for Safety and Security, (2013) 161–168.

107) C.C. Austin, D. Wang, D.J. Ecobichon, G. Dussault, Characterization of volatile organic compounds in smoke at experimental fires, *J. Toxicol. Environ. Health A*. 63 (2001) 191–206.

108) Y. Ito, H. Ohtani, S. Ueda, Y. Nakashima, S. Tsuge, Quantification of end groups in polystyrenes by pyrolysis-gas chromatography, *J. Polym. Sci. part A*, 32 (1994) 383–388.

109) T. Nonobe, H. Ohtani, T. Usami, T. Mori, H. Fukumori, Y. Hirata, S. Tsuge, Characterization of stereoregular polystyrenes by pyrolysis-gas chromatography, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 33 (1995) 121–138.

110) M. Blazso, K. Ujszaszi, E. Jakab, Isomeric structure of styrene-acrylonitrile and styrene-methylacrylate copolymer pyrolysis products, *Chromatographia*, 13 (1980) 151–156.

111) H. Nakagawa, S. Tsuge, Characterization of styrene-divinylbenzene copolymers by high-resolution pyrolysis-gas chromatography, *Macromolecules*, 18 (1985) 2068–2072.

112) R.P. Lattimer, W.J. Kroenke, The formation of volatile pyrolyzates from poly(vinyl chloride), *Appl. Polym. Sci.* 25 (1980) 101–110.

113) R.P. Lattimer, W.J. Kroenke, Mechanisms of formation of volatile aromatic pyrolyzates from poly(vinyl chloride), *Appl. Polym. Sci.* 27 (1982) 1355–1366.

114) A.J. Pidduck, Mass spectrometric analysis of halogenated polymers, *J. Anal. Appl.*

Pyrolysis. 7 (1985) 215–229.

115) N. Sellier, C.E.R. Jones, G. Guiochon, The examination of some vinyl acetate/olefin copolymers by pyrolysis gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 13 (1975) 383–385.

116) D. L. Gardner, I.C. McNeill, The thermal degradation of polychloroprene–2 study of the products of degradation, *Eur. Polym. J.* 7 (1971) 593–602.

117) L. Trojer, I. Ericsson, Pyrolysis gas chromatography studies of insoluble samples. exemplified by vulcanized styrene butadiene rubber, *J. Chromatogr. Sci.* 16 (1978) 345–350.

118) M. Tanaka, F. Nishimura, T. Shono, Pyrolysis-gas chromatography of vinyl chloride-methyl methacrylate and vinyl chloride-acrylonitrile copolymers, *Anal. Chim. Acta.* 74 (1975) 119–124.

119) A. Kondo, H. Ohtani, Y. Kosugi, S. Tsuge, Y. Kubo, H. Inaki, N. Asada, A. Yoshioka, Structural characterization of hydrogenated acrylonitrile-butadiene rubbers by pyrolysis gas chromatography and infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Macromolecules*, 21 (1988) 2918–2924.

120) D.M. Chambers, J.M. Ocariz, M.F. McGuirk, B.C. Blount, Impact of cigarette on volatile organic compound (VOC) blood levels in the U.S. population: NHANES 2003-2004, *Environ. Int.* 37 (2011) 1321–1328.

121) S. Takeuchi, T. Yamada, I. Shikata, Acute toluene poisoning during painting, *Forensic Sci. Int.* 32 (1986) 109–115.

略語一覧

CVSs

combustion-derived volatile substances 燃焼由来揮発性物質

VOC (又は VOCs)

volatile organic compound(s) 揮発性有機化合物

LC

liquid chromatography 液体クロマトグラフィー

GC

gas chromatography ガスクロマトグラフィー

GC-MS

gas chromatograph-mass spectrometer ガスクロマトグラフ質量分析計

I.S.

internal standard 内部標準

MCF

methyl chloroformate クロロギ酸メチル

RSD

relative standard deviation 相対標準偏差

LOD

limit of detection 検出限界

CO

carbon monoxide 一酸化炭素

COHb

carboxyhemoglobin 一酸化炭素ヘモグロビン

謝辞

本研究を完成させるにあたり、素晴らしい研究環境を与えて頂くとともに、多大なるご指導、ご教授を賜りました筑波大学医学医療系法医学の本田克也教授に誠意を表わすとともに深く御礼申し上げます。

研究を進めていくにあたり、懇切丁寧かつ熱心なご助言を頂きました筑波大学医学医療系法医学の石澤不二雄先生に深く感謝の意を表します。

研究や学生生活において様々なご指導を施して下さった東京慈恵医科大学医学部法医学の西健喜助教授に深謝致します。

研究生活において熱い議論を交わしただけでなく精神面まで支えて下さった茨城県警察本部刑事部科学捜査研究所の川端三十一主任研究員に心より感謝致します。

研究に対して優しくご指導していただいた茨城県警察本部刑事部科学捜査研究所の石綿鉄也鑑定官に深く感謝します。

研究の議論を通じ多くの知識や指示を頂きました茨城県警察本部刑事部科学捜査研究所の宮田勝文所長、住谷定男所長代理、矢澤武徳上席鑑定官、古川猛上席鑑定官、桐原美穂主任研究員、吉田努主任研究員、児玉史士研究員、星子健研究員に心より感謝申し上げます。

日常の討論を通じさまざまな経験を与えて下さった法医学研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、今日に至るまでの学生生活を様々な面から支えて頂いた家族の皆様に心から感謝の意を表します。